

Synthese von metallmodifizierten Oligonucleotiden  
mit genregulatorischen Eigenschaften

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplomchemiker Jürgen Schliepe

geboren am 14. 08. 1965 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J. P. Rabe

Gutachter/innen:   1. Prof. Dr. U. Koert  
                          2. Prof. Dr. B. Lippert  
                          3. Prof. Dr. Rademann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.2.1999

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	XV
1 Einleitung und Aufgabenstellungen .....	1
2 Platinierung von Nucleosiden .....	5
3 Syntheseverfahren für Oligonucleotide .....	8
4 Synthesestrategien .....	14
5 Untersuchungen zur Synthese und Ankupplung von Platin - Komplexen an Oligonucleotide nach dem Phosphoramidit - Verfahren .....	21
5.1 Untersuchung der Synthese eines platinieren Nucleosidphosphoramidit - Monomers .....	21
5.2 Ankupplung eines phosphitylierten Nucleobase - Platin - Komplexes an die 5'-Position eines Oligonucleotides .....	26
6 Synthese und Platinierung von O <sup>5'</sup> -DMTr-Thymidin-H-phosphonat und dessen Einbau in Oligonucleotide .....	30
6.1 Festphasensynthese von Oligodesoxynucleotiden nach dem H-Phosphonat - Verfahren .....	30
6.2 Synthese des Monomerenbausteines „Pt-T“ .....	32
6.3 Synthese von platinieren Oligonucleotiden nach dem Standard - H-Phosphonat - Verfahren unter Verwendung des Synthesebausteines „Pt-T“ .....	39
7 Synthese von Oligonucleotiden nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Änderung der Base im Lösungsmittel .....	55
7.1 Voruntersuchungen zur Reaktivität verschiedener organischer Basen gegenüber einem Chloroplatinkomplex .....	55
7.2 Verwendung von N-Methylmorpholin als Base im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren .....	59

7.3	Verwendung von N,N-Diethylanilin als Base im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren .....	64
7.4	Verwendung von 2,6-Lutidin und 2,4,6-Collidin als Basen im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren .....	67
8	Immobilisierung von platinierter Thymidin zur Synthese platinierter Oligonucleotide .....	78
9	Untersuchungen zur Synthese des Monomerenbausteines „Pt-G“ .....	96
10	Präparativer Teil .....	106
10.1	Chemikalien .....	106
10.2	Geräte .....	110
10.3	Synthesevorschriften .....	112
10.4	Methoden .....	133
11	Zusammenfassung .....	139
12	Danksagung .....	142
13	Selbständigkeitserklärung .....	143
14	tabellarischer Lebenslauf .....	144
15	Anlagen .....	147
16	Literaturverzeichnis .....	150

## Abkürzungsverzeichnis

1-MeT <sub>H</sub>	1-Methylthyminat(o)
9-EtG	9-Ethylguanin
A	Adenin (als Bestandteil eines Nucleotides)
Ac	Acetat
AN	Acetonitril
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin (als Bestandteil eines Nucleotides)
COSY	correlation spectroscopy
CPG	Controlled Pore Glas
Coll	2,4,6-Collidin
DC	Dünnschichtchromatogramm / Dünnschichtchromatographie
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DEA	N,N-Diethylanilin
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA	N,N-Dimethylanilin
DMAM	Dimethylaminomethylen
DMF	Dimethylformamid
DMTr	Dimethoxytrityl
DTT	Dithiothreitol
dAde	2'-Desoxyadenosin
dCyt	2'-Desoxycytosin
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytosin-5'-triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
dIno	2'-Desoxyinosin
dGua	2'-Desoxyguanosin
dGua <sub>H</sub>	2'-Desoxyguanosylat(o)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dTTP	3'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
dUrd	2'-Desoxyuridin
EtOH	Ethanol
FIR	fernes Infrarot
G	Guanin (als Bestandteil eines Nucleotides)
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy

HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HPTLC	high performance thin layer chromatography (Hochleistungs - DC)
iHPLC	ion exchange high performance liquid chromatography (Ionenaustausch - HPLC)
iPrOH	Isopropanol
LCAA-CPG	Long Chain Alkylamine Controlled Pore Glas
Lut	2,6-Lutidin
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization
MeIm	N-Methylimidazol
MeOH	Methanol
MM	N-Methylmorpholin
MS	Massenspektroskopie
OD	optische Dichte
Piv	Pivaloyl
Py	Pyridin
RP-	reversed phase (Umkehrphasen -)
T	Thymin (als Bestandteil eines Nucleotides)
TBTU	Benzotriazol-1-yltetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
Thyd	Thymidin
Thyd <sub>H</sub>	Thymidylat(o)
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil (als Bestandteil eines Nucleotides)
Urd	Uridin

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prinzip der Doppelhelix - unterstützten Isomerisierung eines <i>1,3-intrastrand-crosslinks</i> einer <i>trans</i> -Platin - Spezies zu einem platinmodifizierten Basenpaar [6] .....	2
Abb. 2:	Hydrolyse von <i>trans</i> -Platin <b>1a</b> (a) sowie zweite Hydrolysestufe von <i>cis</i> -Platin <b>1b</b> (b) .....	5
Abb. 3:	„Aktivierung“ von <i>trans</i> -Platin durch Umsetzung mit AgNO <sub>3</sub> .....	6
Abb. 4:	pH - abhängiges Gleichgewicht zwischen <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)Cl] <sup>+</sup> <b>2a</b> und <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(OH)] <b>4a</b> .....	6
Abb. 5:	Substitution des Hydroxoliganden der Hydroxoplatin(II) - Gruppe durch unprotonierte Donorliganden [11] .....	6
Abb. 6:	Substitution des Hydroxoliganden der Hydroxoplatin(II) - Gruppe durch schwach saure Liganden [11] .....	6
Abb. 7:	Reihenfolge der absoluten Stabilitätskonstanten für die an der {Pd <sup>II</sup> (dien)} <sup>2+</sup> - Spezies gebundenen Nucleoside bei pH = 7 [29] .....	7
Abb. 8:	Phosphotriester - Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden .....	8
Abb. 9:	H-Phosphonat - Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden .....	10
Abb. 10:	Mögliche Nebenreaktionen des H-Phosphonat - Verfahrens infolge Bildung von Diacylphosphit ( <b>17</b> ) [40] .....	11
Abb. 11:	Phosphoramidit - Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden .....	12
Abb. 12:	Ausbildung eines <i>intrastrand-crosslinks</i> .....	14
Abb. 13:	Oxidation eines Phosphonsäurediesters ( <b>13</b> ) unter Bildung eines Phosphorsäuretriesters ( <b>25</b> ) .....	15
Abb. 14:	Prinzip der Umwandlung eines Oligonucleotides mit <i>intrastrand-crosslink</i> in der platinieren Sequenz d(GNT) bzw. d(TNG) (N = A, C, G, T) in ein Oligonucleotid mit monofunktionaler Platinanbindung ( <b>Zielstruktur 1</b> ) .....	17
Abb. 15:	Synthesestrategie des Synthesebausteines „Pt-T“ zur Einführung von <i>trans</i> -{Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl} <sup>+</sup> - modifiziertem Thymidin während der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren	18

Abb. 16:	Synthesestrategien von zwei Varianten des Synthesebausteines „Pt-G“ zur Einführung von <i>trans</i> - $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$ - modifiziertem 2'-Desoxyguanosin während der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren.....	19
Abb. 17:	Strategie der Synthese des N <sup>3</sup> -platiniierten O <sup>5'</sup> -dimethoxytritylierten Thymidin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidites <b>35a</b> zur Einführung von <i>trans</i> - $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$ - modifiziertem Thymidin während der Oligosynthese nach dem Phosphoramidit - Verfahren .....	19
Abb. 18:	Strategie der Synthese von CPG - gebundenem <i>trans</i> - $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$ - modifiziertem O <sup>5'</sup> -dimethoxytritylierten Thymidin.....	20
Abb. 19:	Synthese von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(1\text{-MeT}_{\text{-H}})]$ ( <b>38a</b> ) in DMF nach [10].....	21
Abb. 20:	Direkte Synthese von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}\text{-DMTr-Thyd}_{\text{-H}})]$ ( <b>34a</b> ) in DMF .....	22
Abb. 21:	Phosphitylierung von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}\text{-DMTr-Thyd}_{\text{-H}})]$ ( <b>34a</b> ).....	23
Abb. 22:	HPTLC der Phosphitylierung von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}\text{-DMTr-Thyd}_{\text{-H}})]$ ( <b>34a</b> ) (Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{iPrOH} = 95/5 + 1\% \text{ TEA}$ , an Kieselgel).....	23
Abb. 23:	Deplatinierung des Thymidinderivates als Nebenreaktion während der Phosphitylierung von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}\text{-DMTr-Thyd}_{\text{-H}})]$ <b>34a</b> .....	24
Abb. 24:	<sup>31</sup> P-NMR - Spektrum des phosphitylierten <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}\text{-DMTr-Thyd}_{\text{-H}})]$ <b>35a</b> (teilweise zersetzt) in $\text{CDCl}_3$ .....	25
Abb. 25:	Phosphitylierung von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{N}-(2\text{-Aminoethanol})(1\text{-MeT}_{\text{-H}})]^+$ <b>45</b> .....	26
Abb. 26:	HPLC der Produkte der Synthese von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-}\{(T)_5\text{-P}^{5'}\})(1\text{-MeT}_{\text{-H}})]^+$ ...	27
Abb. 27:	HPL - Chromatogramme a) des präparativ isolierten <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-O-}\{(T)_5\text{-P}^{5'}\})(1\text{-MeT}_{\text{-H}})]^+$ , b) des abgetrennten unmodifizierten Produktes und c) des unmodifizierten 5-mers $(T)_5$ .....	27
Abb. 28:	HPL - Chromatogramm von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-}\{(T)_5\text{-P}^{5'}\})(1\text{-MeT}_{\text{-H}})]^+$ nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase .....	28
Abb. 29:	Vermutetes primäres Hydrolyseprodukt des enzymatischen Abbaus von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-O-}\{(T)_5\text{-P}^{5'}\})(1\text{-MeT}_{\text{-H}})]^+$ .....	28
Abb. 30:	HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthesen von O <sup>5'</sup> -DMTr-d(TTTCCCTTTT), hergestellt a) nach dem Amidit - Verfahren und b) nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Pivaloylchlorid als Aktivierungsreagenz; HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthesen von O <sup>5'</sup> -DMTr-	

	d(CCCTTTCCCC), hergestellt c) mit Pivaloylchlorid und d) mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsreagenz nach dem H-Phosphonat - Verfahren.....	31
Abb. 31:	Synthese von Natrium-O <sup>5'</sup> -DMTr-Thymidin-3'-H-phosphonat ( <b>15d</b> ).....	32
Abb. 32:	<sup>1</sup> H-NMR - Spektren a) von Natrium-O <sup>5'</sup> -DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat ( <b>15d</b> ) und b) von Kaliumnatrium-O <sup>5'</sup> -DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat ( <b>48</b> ) in DMF-d <sub>7</sub> .....	34
Abb. 33:	<sup>1</sup> H-NMR - Spektrum von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(O <sup>5'</sup> -DMTr-Thyd. <sub>H</sub> -3'-H-phosphonato)] ( <b>29a</b> ) .....	35
Abb. 34:	FIR - Spektrum des DMF - haltigen (Bild A) sowie des DMF - freien (Bild B) <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(O <sup>5'</sup> -DMTr-Thyd. <sub>H</sub> -3'-H-phosphonato)] ( <b>29a</b> ) a) vor und b) nach Behandlung mit konz. NH <sub>3</sub> - Lösung, FIR - Spektrum von <i>trans</i> -Platin ( <b>1a</b> ) (Bild C, a) sowie der PE - Matrix ohne Substanz (Bild C, b) .....	36
Abb. 35:	Synthese von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] ( <b>1c</b> ).....	37
Abb. 36:	Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Umsetzung von Thymidylat mit Chloro - bzw. Bromoplatin(II) - Komplexen in DMF .....	38
Abb. 37:	HPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthesen von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit dem Chloroisomer des platiniierten Synthesebausteins nach Entblockung a) mit konz. NH <sub>3</sub> für 16h bei 30°C und b) mit 0.18 M NaOH für 12h bei 40°C und 18h bei RT .....	39
Abb. 38:	HPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthesen von d(CXCA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese a) mit dem Chloroisomer des platiniierten Synthesebausteins nach Entblockung mit 0.18 M NaOH für 15h bei 50°C, b) mit dem Bromoisomer des platiniierten Synthesebausteins nach Entblockung mit 0.18 M NaOH für 12h bei 40°C und 18h bei RT und c) mit dem Bromoisomer des platiniierten Synthesebausteins nach Entblockung mit konz. NH <sub>3</sub> für 14h bei 40°C .....	40
Abb. 39:	HPL-Chromatogramme von a) d(ATAGTATACAGA) und b) <i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(ATAGTATACAGA)-N <sup>3</sup> -T(7)}] <sup>+</sup> nach enzymatischer Hydrolyse.....	42
Abb. 40:	HPL-Chromatogramme von a) [Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (Thyd. <sub>H</sub> )] <sup>+</sup> , b) <i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )], c) eines Gemisches von <i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] und <i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py(Thyd. <sub>H</sub> )] <sup>+</sup> , d) unter Verwendung des Chloroisomers des platiniierten Synthesebausteines „Pt-T“ synthetisiertes und mit konz. NH <sub>3</sub> entblocktes d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) nach enzymatischer Hydrolyse und e) <i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(AT)-N <sup>3</sup> -T(2)}] <sup>+</sup> .....	43
Abb. 41:	HPL-Chromatogramme von a) <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )], b) [Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (Thyd. <sub>H</sub> )] <sup>+</sup> , c) <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py(Thyd. <sub>H</sub> )] <sup>+</sup> , d) unter Verwendung des Bromoisomers des platiniierten	



	Synthesebausteines „Pt-T“ synthetisiertes und mit 0.18 M Natronlauge entblocktes d(CXCA) (X = Pt-T) nach enzymatischer Hydrolyse und e) <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(CT)-N <sup>3</sup> -T(2)}] <sup>+</sup> ..... 44	44
Abb. 42:	HPL-Chromatogramme von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(CTCA)-N <sup>3</sup> -T(2)}] <sup>+</sup> a) vor und b) nach Behandlung mit 0.3 M CN <sup>-</sup> für 24 h bei 50°C sowie von c) d(CTCA) ..... 45	45
Abb. 43:	HPL-Chromatogramme von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(ATAGTATACAGA)-N <sup>3</sup> -T(7)}] <sup>+</sup> a) vor und b) nach Behandlung mit 0.3 M CN <sup>-</sup> für 24 h bei 50°C sowie von c) d(ATAGTATACAGA) ..... 45	45
Abb. 44:	Gelelektrophorese von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(CTCA)-N <sup>3</sup> -T(2)}] <sup>+</sup> vor (Bahn 1, Bild A) und nach Deplatinierung mit CN <sup>-</sup> (Bahn 2, Bild A) sowie von d(CTCA) (Bahn 3, Bild A), von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(ATAGTATACAGA)-N <sup>3</sup> -T(7)}] <sup>+</sup> vor (Bahn 1, Bild B) und nach Deplatinierung mit CN <sup>-</sup> (Bahn 2, Bild B) sowie von d(ATAGTATACAGA) (Bahn 3, Bild B) in 20 % Acrylamid/Bisacrylamid + 7 M Harnstoff ..... 46	46
Abb. 45:	Prinzip der Sequenzierung nach <i>Sanger</i> ..... 47	47
Abb. 46:	Synthese von Thymidin-5'-triphosphat nach <i>Ludwig</i> und <i>Eckstein</i> [63] ..... 48	48
Abb. 47:	Reaktionsschema der Phosphorylierung eines vollständig geschützten Oligonucleotides durch Umsetzung mit Salicylochlorophosphit (49) und nachfolgender Oxidation mit I <sub>2</sub> /Base/H <sub>2</sub> O ..... 48	48
Abb. 48:	iHPL-Chromatogramme a) von (T) <sub>5</sub> sowie von (T) <sub>5</sub> nach 5'-Phosphitylierung mit Salicylochlorophosphit (49) und Oxidation b) mit Pharmacia - Oxidationslösung <sup>9</sup> bzw. c) mit 2% I <sub>2</sub> in Py/H <sub>2</sub> O = 98/2 ..... 49	49
Abb. 49:	HPL-Chromatogramme a) von (T) <sub>5</sub> sowie von (T) <sub>5</sub> nach 5'-Phosphitylierung mit Salicylochlorophosphit (49) und Oxidation b) mit Pharmacia - Oxidationslösung <sup>9</sup> bzw. c) mit 2% I <sub>2</sub> in Py/H <sub>2</sub> O = 98/2 ..... 50	50
Abb. 50:	Schematische Darstellung der Ligation ..... 51	51
Abb. 51:	12% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der Ligation des 5'-phosphorylierten d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) und d(ATAGTAXACAGA) (X = T: Bahn 1, X = <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py(N <sup>3</sup> -T)] <sup>+</sup> : Bahn 3) in Gegenwart von d(AGCTTGCATGCCTCTGT) als Templat - Strang mit T4-DNA-Ligase sowie von d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) (Bahn 2) ..... 51	51
Abb. 52:	Detektion der Sequenzierung von d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) nach <i>Sanger</i> mit T7 DNA - Polymerase unter Verwendung der Terminationsmische 1/5 und Abbruch der Polymerasereaktion nach 5 min am A.L.F. .... 52	52

Abb. 53:	Detektion der Sequenzierung von d(ATAGTATACAGAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) nach <i>Sanger</i> mit T7 DNA - Polymerase unter Verwendung der Terminationsmische 1/5 und Abbruch der Polymerasereaktion nach 1 min am A.L.F. ....	53
Abb. 54:	Detektion der Sequenzierung von d(ATAGTAXACAGAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) (X = <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py(N <sup>3</sup> -T)] <sup>+</sup> ) nach <i>Sanger</i> mit T7 DNA - Polymerase unter Verwendung der Terminationsmische 1/5 und Abbruch der Polymerasereaktion a) nach 5 min und b) nach 1 min am A.L.F. ....	53
Abb. 55:	Reaktion von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ) mit Pyridin .....	55
Abb. 56:	HPL-Chromatogramme a) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ), b) nach zweimaliger Codestillation mit Pyridin, c) nach 30 min Reaktion mit Pyridin bei 50°C sowie d) nach 30 min Reaktion mit Pyridin bei 90°C .....	56
Abb. 57:	HPL-Chromatogramme a) der Produkte der Reaktion von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ) mit N,N-Diethylanilin für 30 min bei 90°C sowie b) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ).....	56
Abb. 58:	HPL-Chromatogramme a) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ) (größtenteils hydrolysiert) sowie b) der Produkte der Reaktion von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] mit N-Methylmorpholin für 30 min bei 90°C .....	56
Abb. 59:	Reaktion von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ) mit 2,6-Lutidin .....	57
Abb. 60:	HPL-Chromatogramme a) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>61a</b> ), der Produkte der Reaktion von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] mit Lut/H <sub>2</sub> O nach 30 min b) bei 50°C sowie c) bei 90°C .....	57
Abb. 61:	Kupplungsreaktion des Diacylphosphits <b>17</b> mit der 5'-Hydroxygruppe des bereits synthetisierten Oligomers ( <b>5</b> ) .....	59
Abb. 62:	iHPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthesen von d(GGGA) nach dem H-Phosphonat - Verfahren in MM/AN = 1/3 bei Verwendung a) der 3-fachen und b) der 10-fachen Menge an Piv- Cl als Aktivierungsreagenz nach Entblockung mit konz. NH <sub>3</sub> , c) von d(CGGA) nach dem H-Phosphonat - Verfahren in MM/AN = 1/3 bei Verwendung der 10-fachen Menge an Piv-Cl nach Entblockung mit konz. NH <sub>3</sub> , NaCl <sub>sa</sub> , d) von d(TTTA), synthetisiert unter Standardbedingungen .....	60
Abb. 63:	HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) nach Entblockung mit KBr <sub>sa</sub> /25% NH <sub>3</sub> unter Verwendung des H-Phosphonat - Verfahrens in N- Methylmorpholin/Acetonitril = 1/3 a) 1. Produktfraktion (KBr <sub>sa</sub> /25% NH <sub>3</sub> - Lösung nach Abziehen des NH <sub>3</sub> i.V.) sowie b) 2. Produktfraktion bei 60°C .....	62

- Abb. 64: 20% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der ersten (Bahn 1) sowie der zweiten Produktfraktion (Bahn 2) der Synthese von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) nach Entblockung mit  $\text{KBr}_{\text{sa}}/25\%$   $\text{NH}_3$  und Entsalzung mit Sephadex G-25 unter Verwendung des H-Phosphonat - Verfahrens in N-Methylmorpholin/Acetonitril = 1/3 sowie von d(ATAGTATACAGA) (Bahn 3)..... 62
- Abb. 65: iHPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von  $(\text{T})_4$ , synthetisiert nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit zweifacher Menge an Aktivierungsreagenz Pivaloylchlorid und doppeltem Substanzaufwand pro Kupplungsschritt in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  ..... 64
- Abb. 66: HPL-Chromatogramme der Produkte a) der Synthese von  $(\text{T})_{12}$  nach Standard - H-Phosphonat - Verfahren sowie b) der Synthese von  $(\text{T})_{15}$  durch Verlängerung des nach dem Standard - H-Phosphonat - Verfahren hergestellten  $(\text{T})_{12}$  um  $(\text{T})_3$  nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsmittel in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  ..... 65
- Abb. 67: 20% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der in Abb. 66a (Bahn 1) sowie der in Abb. 66b (Bahn 2) untersuchten Proben ..... 66
- Abb. 68: HPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von  $(\text{T})_5$  nach dem H-Phosphonat - Verfahren in 2,4,6-Collidin/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  ..... 67
- Abb. 69: HPL-Chromatogramme der Produkte der in Anlage 8 dargestellten Synthese von d(CXCG) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  a) vor sowie b) nach 24h Behandlung mit  $\text{CN}^-$  bei  $50^\circ\text{C}$ ..... 68
- Abb. 70: 20% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der Produkte der in Anlage 8 dargestellten Synthese vor (Bahn 1) und nach Behandlung mit  $\text{CN}^-$  (Bahn 2)..... 68
- Abb. 71: HPL-Chromatogramme der nach Gelelektrophorese isolierten Oligonucleotide a) d(CTCA) und b) d(CCG) nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase ..... 69
- Abb. 72: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(XT) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ (**29c**) a) nach zweifacher Codestillation mit AN sowie b) ohne vorherige Codestillation nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$ ..... 70
- Abb. 73: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(TXTG) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ **29c** nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  a) vor und b) nach 24h Behandlung mit  $\text{CN}^-$

	bei 50°C, nach Entblockung mit 0.15 M NaOH c) vor und d) nach 24h Behandlung mit CN <sup>-</sup> bei 50°C sowie e) von d(TTTG) .....	71
Abb. 74:	HPL-Chromatogramme a) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> {d(TTTG)-N <sup>3</sup> -T(2),N <sup>7</sup> -G(4)}] <sup>+</sup> sowie b) von d(TTG) nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase	72
Abb. 75:	HPL-Chromatogramme von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> {d(TTTG)-N <sup>3</sup> -T(2),N <sup>7</sup> -G(4)}] <sup>+</sup> a) vor sowie b) nach 24h Behandlung mit CN <sup>-</sup> bei 50°C, c) von d(TTTG), des Hauptproduktes der in Abb. 73c dargestellten Produkte (d(TTG)) d) vor sowie e) nach 24h Behandlung mit CN <sup>-</sup> bei 50°C .....	73
Abb. 76:	Strukturformel von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> {d(TTTG)-N <sup>3</sup> -T(2),N <sup>7</sup> -G(4)}] <sup>+</sup> .....	73
Abb. 77:	HPL-Chromatogramme a) von d(TGTACCAGCT) sowie der Produkte der Synthese von d(XTGTACCAGCT) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach 24 Behandlung mit einer gesättigten wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) nach Entblockung b) mit konz. NH <sub>3</sub> bzw. c) mit 0.15 M NaOH .....	74
Abb. 78:	HPL-Chromatogramme a) von d(TGTACCAGCT) sowie b) von d(TTGTACCAGCT) nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase .....	75
Abb. 79:	HPL-Chromatogramme a) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] sowie der Produkte der Reaktion von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(Thyd. <sub>H</sub> )] mit 1H-Tetrazol in Wasser für 45 Minuten b) bei 50°C und c) bei 90°C	76
Abb. 80:	Schema der Immobilisierung von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py(O <sup>5'</sup> -DMTr-Thyd. <sub>H</sub> )] ( <b>34e</b> ) durch Schürer <i>et al.</i> [73] .....	78
Abb. 81:	HPL-Chromatogramme der wäßrigen Lösungen von 2'-Desoxyguanosin nach Behandlung mit immobilisiertem platinieren Thymidin a) synthetisiert entsprechend Abb. 85 nach 7 d bei RT, b) synthetisiert von Schürer <i>et al.</i> [73] entsprechend Abb. 80 nach 6 d bei RT, c) HPL-Chromatogramm von Wasser nach Behandlung mit immobilisiertem platinieren Thymidin, synthetisiert von Schürer <i>et al.</i> [73] entsprechend Abb. 80 nach 6 d bei RT .....	79
Abb. 82:	HPL-Chromatogramme der Lösungen von Oligonucleotidsynthesen unter Verwendung des von Schürer <i>et al.</i> [73] (vgl. Abb. 80) immobilisierten platinieren Thymidins ( <b>66e</b> ) nach Entblockung a) von d(AX), b) von d(CX) und c) von d(CTTGTACCAGCX) (X = Pt-T) mit konz. NH <sub>3</sub> sowie d) von d(CTTGTACCAGCX) (X = Pt-T) mit 0.18 M NaOH .....	81
Abb. 83:	HPL - Chromatogramm a) der in Abb. 82c dargestellten Probe nach enzymatischer Hydrolyse sowie b) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py(Thyd. <sub>H</sub> )] <sup>+</sup> .....	81
Abb. 84:	HPL - Chromatogramme a) der in Abb. 82a und b) der in Abb. 82b dargestellten Probe nach enzymatischer Hydrolyse sowie c) von <i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PyT. <sub>H</sub> ] <sup>+</sup> .....	82

Abb. 85:	Reaktionsschema der 3'-Succinoylierung von $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$ .....	83
Abb. 86:	UV - Spektren der Behandlung des 3'-trägergebundenen $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ ( <b>66a</b> ) mit Wasser nach 1.5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6h, 8 h und 22 h .....	84
Abb. 87:	UV - Spektren der Reaktion des 3'-trägergebundenen $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ ( <b>66a</b> ) mit 2'-Desoxyguanosin in Wasser nach 0 min, 1.5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6h, 8 h und 22 h .....	84
Abb. 88:	UV - Spektren der Behandlung des unbeladenen LCAA-CPG ( <b>64</b> ) mit 2'-Desoxyguanosin in Wasser nach 0 min, 1.5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6h und 22 h .....	85
Abb. 89:	Abnahme der Extinktion einer wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin bei 252 nm infolge Behandlung mit einem unbeladenen ( <b>64</b> ) sowie einem mit $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ beladenen LCAA-CPG - Träger ( <b>66a</b> ) .....	85
Abb. 90:	HPL-Chromatogramme der Lösung der Umsetzung einer gesättigten wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0, mit 3'-trägergebundenem $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ ( <b>66a</b> ) nach Abspaltung vom Träger a) mit konz. $NH_3$ , b) mit 0.18 M NaOH, c) der Umsetzung mit $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$ in Lösung sowie d) von $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$ .....	86
Abb. 91:	Basenpaarung des deprotonierten und $N^7$ - platinieren 2'-Desoxyguanosins ( $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2(N^7-dGua_{-H})(Thyd_{-H})]$ ) mit 2'-Desoxyguanosin .....	87
Abb. 92:	HPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthese von d(CG CX) (X = 3'-trägergebundenes $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ ) ( <b>66a</b> ) mit dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN nach 24 h in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C und Entblockung mit konz. $NH_3$ a) vor und b) nach Deplatinierung mit $CN^-$ .....	88
Abb. 93:	Gelelektrophorese der Produktgemische der Synthese von d(CG CX) (X = 3'-trägergebundenes $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ ) ( <b>66a</b> ) mit dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN nach 24 h in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C, Entblockung mit konz. $NH_3$ und Entsalzung mit Sephadex G-10 vor (Bahn 1) und nach Deplatinierung mit $CN^-$ (Bahn 2) sowie von d(CTCA) (Bahn 3) in 20 % Acrylamid/Bisacrylamid + 7 M Harnstoff .....	88
Abb. 94:	HPL-Chromatogramm des Produktgemisches der Synthese von d(TG TX) (X = 3'-trägergebundenes $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$ ) ( <b>66a</b> ) mit dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN nach 24 h in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C und Entblockung mit 0.15 M NaOH .....	89
Abb. 95:	HPL-Chromatogramme der in Abb. 94 a) mit 1 sowie c) mit 2 markierten isolierten Produktpeaks vor sowie b) bzw. d) nach Deplatinierung mit $CN^-$ .....	89

- Abb. 96: HPL-Chromatogramme der in Abb. 94 a) mit 1 sowie b) mit 2 markierten isolierten Produktpeaks nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase, c) HPL-Chromatogramm der Produkte der Umsetzung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) mit *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] ..... 90
- Abb. 97: HPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) nach Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub> 91
- Abb. 98: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) nach Reaktion mit dGua<sub>sa</sub> in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) für 24 h bei 50°C) und Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub> a) vor sowie b) nach Behandlung mit CN<sup>-</sup>, c) HPL-Chromatogramm von d(CTTGTACCAGCT) ..... 92
- Abb. 99: HPL-Chromatogramme eines Produktpeaks der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) (X = Pt-T) a) vor sowie b) nach Behandlung mit CN<sup>-</sup>, c) HPL-Chromatogramm von d(CTTGTACCAGCT) ..... 92
- Abb. 100: Gelelektrophorese eines Produktpeaks der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) (X = Pt-T) vor (Bahn 1) und nach Deplatinierung mit CN<sup>-</sup> (Bahn 2) sowie von d(CTTGTACCAGCT) (Bahn 3) ... 93
- Abb. 101: iHPL-Chromatogramme a) des in Abb. 99a dargestellten isolierten Produktpeaks, b) von d(CTTGTACCAGCT), c) von d(TCCCGGTCACCTTGTACCAGCT) und d) von d(AAGCTTTCCCGGTCACCTTGTACCAGCTGGC) ..... 93
- Abb. 102: iHPL-Chromatogramme a) der Produkte der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)Pt<sup>II</sup>] (**66a**) nach Entblockung bzw. Entschützung mit konz. NH<sub>3</sub> sowie b) von d(CTTGTACCAGCT) ..... 94
- Abb. 103: Synthese von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin ..... 97
- Abb. 104: Syntheseweg der Platinierung der N<sup>1</sup>-Position von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) ..... 97
- Abb. 105: <sup>1</sup>H-NMR - Spektren a) von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) und b) Kalium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylat (**70**) in DMSO-d<sub>6</sub> ..... 98
- Abb. 106: <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) in DMF-d<sub>7</sub> 100
- Abb. 107: <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-HMQC - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) in DMF-d<sub>7</sub> ..... 100
- Abb. 108: <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-HMBC - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) in DMF-d<sub>7</sub> ..... 101

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemische Verschiebungen $\delta$ (ppm) der $^1\text{H}$ - Atome von Natrium- $\text{O}^{5'}$ -DMTr-thymin-3'-H-phosphonat ( <b>15d</b> ), Kalium-natrium- $\text{O}^{5'}$ -DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat ( <b>48</b> ), <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}$ -DMTr-Thyd. <sub>H</sub> -3'-H-phosphonato)] ( <b>29a</b> ) und <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Br}(\text{O}^{5'}$ -DMTr-Thyd. <sub>H</sub> -3'-H-phosphonato)] ( <b>29c</b> ) in DMF- $\text{d}_7$ .....	35
Tabelle 2:	Isolierte Produktmengen, Produktausbeuten und bestimmte Molmassen der isolierten Hauptprodukte der Synthesen von d(CXCA) und d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) unter den Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese im 0.2 $\mu\text{mol}$ - Synthesemaßstab bei Verwendung des Chloro- bzw. des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ ( <b>29</b> ).....	41
Tabelle 3:	Quantifizierung der Bruttozusammensetzung von <i>trans</i> - $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Py}\{\text{d}(\text{ATAGTATACAGA})\text{-N}^3\text{-T(7)}\}]^+$ durch Vergleich der aus dem HPL-Chromatogramm (Abb. 39b) durch Integration der Peaks erhaltenen Peakflächen mit denen von d(ATAGTATACAGA) (Abb. 39a).....	42
Tabelle 4:	Oligonucleotidsynthesen mit dem von Schürer <i>et al.</i> [73] (vgl. Abb. 80) synthetisierten trägergebundenen platinieren Thymidin ( <b>66e</b> ) .....	80
Tabelle 5:	Chemische Verschiebungen $\delta$ (ppm) der $^1\text{H}$ - Atome von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{N}^1\text{-(O}^{5'}$ -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua. <sub>H</sub> ))] ( <b>71a</b> ) und $\text{O}^{5'}$ -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua ( <b>68</b> ) in DMF- $\text{d}_7$ .....	102
Tabelle 6:	Chemische Verschiebungen $\delta$ (ppm) der $^{13}\text{C}$ - Atome von $\text{O}^{5'}$ -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua ( <b>68</b> ) und <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{N}^1\text{-(O}^{5'}$ -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua. <sub>H</sub> ))] ( <b>71a</b> ) in DMF- $\text{d}_7$ .....	103
Tabelle 7:	Theoretische und mit Hilfe von MALDI ermittelte Molmassen von <i>trans</i> - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{N}^1\text{-(O}^{5'}$ -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua. <sub>H</sub> ))] ( <b>71a</b> ).....	104

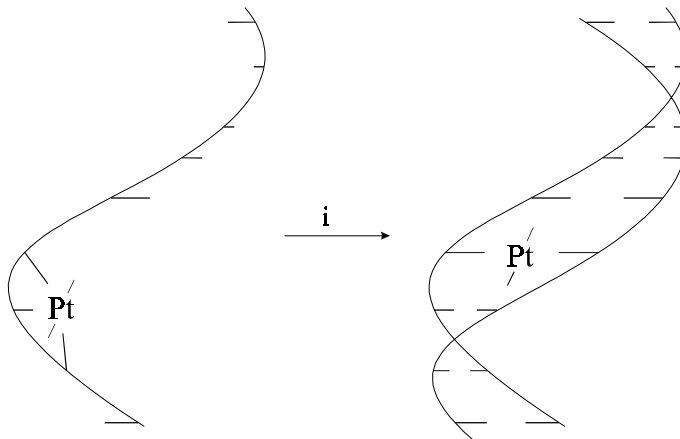
## 1 Einleitung und Aufgabenstellungen

Einer der möglichen Ansätze zur gezielten Therapie von Viruserkrankungen, Krebs und anderen genetisch bedingten Krankheiten ist die selektive Unterdrückung der Genexpression mit Hilfe von Antisense - Oligonucleotiden [1][2]. Diese erkennen den komplementären Bereich der mRNA oder der DNA durch sequenzspezifische Basenpaarung und behindern so die Translation bzw. die Transkription. Dies führt zu einer selektiven Hemmung der Proteinsynthese [1][2]. Je nach Art der Zielsequenz werden zwei prinzipielle Wege unterschieden. In der Antisense - Strategie ist die Zielsequenz des synthetischen Oligomers die einzelsträngige mRNA, in der Antigen - Strategie ist das Ziel die als Doppelhelix vorliegende DNA [2][3]. Antisense - Oligonucleotide treten auch natürlich auf, bestimmte Proteine werden durch intrazellulär freigesetzte RNA, die zu Teilen einer bestimmten mRNA komplementär ist, herunter reguliert [4]. Dabei bildet sich ein RNA/RNA - Duplex [4].

Ein zur therapeutischen Anwendung geeignetes Antisense - Oligonucleotid muß verschiedenen Anforderungen entsprechen, vor allem Beständigkeit gegenüber Nucleaseabbau und Affinität zur Ziel - Nucleinsäure mit spezifischer Zielerkennung, aber auch eine effiziente Aufnahme durch die Zelle sollte gegeben sein [2]. Verschiedene chemisch modifizierte Oligonucleotide wurden synthetisiert, um diese Eigenschaften zu erzielen. Modifikationen wurden hauptsächlich an dem Phosphat - Rückgrat (Phosphorthioate, Phosphoramidate, Methylphosphonate u.a.) und am Zucker ( $\alpha$ -Nucleoside, hexopyranosylanalogue Nucleoside, 4'-Thionucleoside u.a.) durchgeführt und führen in der Regel zu Nucleasebeständigkeit, Modifikationen am Phosphat - Rückgrat haben jedoch meist eine verringerte Affinität zur RNA zur Folge, z.B. bei Phosphorthioatoligomeren [2]. Für die Wirksamkeit der Hemmung der Genexpression der Phosphorthioate und auch anderer Oligomere werden unspezifische Effekte diskutiert, d.h. deren Wirksamkeit ist nicht auf einen Antisense - Mechanismus zurückzuführen [2]. Im Gegensatz dazu wird ein sequenzspezifischer Antisense - Effekt erzielt, wenn die Nucleobasen Cytosin und Thymin durch 5-Propinylcytosin bzw. -uracil ersetzt werden, da diese offenbar eine erhöhte Affinität zur RNA aufweisen [2]. Zur Verbesserung der Zellaufnahme von Antisense - Oligomeren wurden Konjugate mit verschiedenen lipophilen Molekülen (Polylysin, PEG u.a.) synthetisiert, welche die notwendige Konzentration für eine Aktivität verringern [1][2]. Um die Wirksamkeit der Oligonucleotide in der Zelle nicht zu beeinträchtigen, wurden Linker für diese Konjugate synthetisiert, die durch intrazelluläre Enzyme gespalten werden (Disulfide, Ester) [2]. Ein anderer Weg zur Erzielung einer guten Aufnahme durch die Zelle ist die Verwendung von Liposomen als Träger, diese können in der Zelle als Depot dienen und die Oligonucleotide langsam freisetzen [5]. Verschiedene Ansätze wurden auch durchgeführt, die Affinität zur komplementären Zielsequenz zu erhöhen bzw. diese dauerhaft zu machen [1][2]. Hierzu



zählen die Affinitätssteigerung durch Interkalatormoleküle wie z.B. Acridin - Derivate, die Fotovernetzung über ein angebundenes Farbstoffmolekül sowie die irreversible Verknüpfung zur Zielsequenz mit Hilfe von alkylierenden Oligonucleotiden [1]. Ebenfalls hinzuzurechnen sind jüngste Arbeiten, bei denen das Antisense - Oligonucleotid über die  $trans\text{-}\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$  - Spezies mit der Zielsequenz unter Nutzung des Prinzips der Doppelhelix - unterstützten Isomerisierung eines *1,3-intrastrand-crosslinks* einer *trans*-Platin - Spezies zu einem platinmodifizierten Basenpaar verknüpft wird (Abb. 1) [6][7][8].



i: Hybridisierung mit Gegenstrang

Abb. 1: Prinzip der Doppelhelix - unterstützten Isomerisierung eines *1,3-intrastrand-crosslinks* einer *trans*-Platin - Spezies zu einem platinmodifizierten Basenpaar [6]

Dabei lagert sich ein *1,3-intrastrand-crosslink* von *trans*-Platin an der Sequenz  $\text{GNG-N}^7, \text{N}^7$  ( $\text{N} = \text{A, C, T}$ ) innerhalb eines Oligonucleotides der Länge von 18 bzw. 22 Basenpaaren nach Hybridisierung mit dem komplementären Strang zu einem *interstrand-crosslink* des 5'-G mit dem dazu komplementären C um. Die Geschwindigkeit der Umlagerung erhöht sich deutlich, wenn das komplementäre Trinucleotid 5'-CNC ( $\tau_{1/2} \geq 3 \text{ h}$  bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{N} = \text{A, C, T}$ ) durch eines der Dinucleotide 5'-CA oder 5'-UA ( $\tau_{1/2}$  wenige Minuten) ersetzt wird [8]. Der platinierter Einzelstrang ist stabil und selbst gegenüber 10 mM Glutathion inert [8].

Grundlegender Ansatz dieser Arbeit ist die Synthese eines an der Nucleobase mit der  $trans\text{-}\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$  - Spezies modifizierten Oligonucleotides, welches entsprechend dem Antisense- bzw. dem Antigenkonzept die Zielsequenz erkennt und nach Hybridisierung in der Lage ist, mit dem Gegenstrang eine metallmodifizierte Basenpaarung einzugehen [9]. Diese Herangehensweise entspricht damit weitestgehend der der zuletzt erwähnten Arbeiten, in denen die Anbindung des Antisense - Oligonucleotides zur Zielsequenz über einen Platinkomplex erfolgt. Zur Erklärung dieser Parallelen sei erwähnt, daß die zitierten Arbeiten [6]-[8] ebenso wie das Prinzip der Doppelhelix - unterstützten Isomerisierung [6], das all jenen Arbeiten zugrunde liegt, zu Beginn der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht erschienen waren bzw. völlig unbekannt war. Das Metall ersetzt formal ein an einer Wasserstoffbrücke beteiligtes Proton eines Basenpaares. Je nach Art der Zielsequenz (Einzelstrang oder

Doppelstrang) sind metallmodifizierte Watson-Crick - , umgekehrte Watson-Crick - , Hoogsteen - , reverse Hoogsteen - sowie nicht - komplementäre Basenpaare möglich [10]. Eine Reihe solcher platinmodifizierten Basenpaare mit Modellnucleobasen wie 1-Methylthymine, 9-Ethylguanin usw. wurden bereits synthetisiert [10][11]. Die *trans*- $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$  - Spezies soll dazu an eine Nucleobase eines Oligonucleotides angebunden sein und in *trans* - Stellung eine austauschbare Gruppe tragen, die unter den Bedingungen der Hybridisierung gegen die (komplementäre) Nucleobase des Gegenstranges austauscht. Ist die Zielsequenz eine mRNA, sollte sich nach Hybridisierung und Koordination des Platins am Gegenstrang eine dauerhafte Anhaftung des Oligonucleotides an der RNA ergeben und so die Translation blockiert werden. Ist die Zielsequenz hingegen die DNA, sollte nicht nur die Transkription des betreffenden DNA - Abschnittes blockiert werden. Durch die Ausbildung eines Platin - *crosslinks* zur DNA sollte auch die Replikation gehemmt werden.

Der Einfluß von Platinkomplexen auf die Replikation von Zellen wurde erstmals von *Rosenberg et al.* beobachtet [12]. *Rosenberg et al.* untersuchten den Einfluß schwachen Wechselstromes auf die Zellteilung von *E. coli*. Dafür fanden scheinbar inerte Platinelektroden Verwendung, es wurde eine Hemmung der Zellteilung ohne Hinderung des Wachstums beobachtet [12]. Das führte zur Entdeckung der Antitumoraktivität von *cis*-Platin [13]. Die DNA stellt das Hauptangriffsziel von *cis*-Platin dar (*Roberts et al.* 1986) [14]. Die durch bifunktionale Anbindung des *cis*-Platins an die DNA entstehenden *crosslinks* werden als die aktiven Zentren angesehen [15]. In der chemotherapeutischen Anwendung von Platinkomplexen erwies sich *trans*-Platin als das klinisch inaktive Isomer des *cis*-Platins [16]. Untersuchungen über die Ursachen haben ergeben, daß die monofunktionale Anbindung sehr ähnlich, die bifunktionale Anbindung von *trans*-Platin jedoch wesentlich langsamer erfolgt. Als Ursache dafür betrachtet man die insbesondere zur Bildung von *intrastrand-crosslinks* des *trans*-Platins notwendigen sterischen Verzerrungen des Oligonucleotides, die deutlich stärker sind als bei *cis*-Platin und daher langsamer erfolgen [17]. Monofunktionale *trans*-Platin - Addukte wandeln sich bei niedrigem Platinierungsgrad nur langsam in bifunktionale Platinanbindungen um, wobei hauptsächlich *interstrand-crosslinks* entstehen [18]. Die zweite verfügbare Koordinationsstelle von *trans*-Platin reagiert daher bevorzugt mit anderen Nucleophilen, vor allem mit Glutathion. Dieses „Abfangen“ durch Glutathion führt zur Verhinderung einer bifunktionalen Anbindung und zur Lockerung der Bindung zur DNA [19][20]. *Sherman* und *Lippard* zeigten, daß auch *trans*-Platin die Replikation hemmt [21]. Für die DNA - Replikation in gereinigten Systemen gilt, daß die DNA - Polymerasen (an sich) nicht durch Platinkomplexe inaktiviert, aber durch bifunktionale Platin(II) - Addukte am Fortschreiten bei der DNA - Replikation am Templatstrang gehemmt („festgehalten“) werden (*Holler* 1993) [22]. Durch *interstrand-crosslinks* werden folglich beide DNA - Stränge (bis zu einer möglichen Reparatur) unreplizierbar. Weiterhin wurde festgestellt, daß die Reparatur von bifunktionalen *trans*-Platin - Addukten langsamer als die der *cis*-Platin - Addukte erfolgt [22]. Gelingt es folglich, die Ausbildung eines *interstrand-crosslinks* von *trans*-Platin zur

DNA ohne Abfangen der Platinspezies durch andere Nucleophile zu realisieren, sollte so zusätzlich zur Hemmung der Transkription des betreffenden DNA - Abschnittes eine Hemmung der Replikation der DNA auftreten.

Die Bindung eines Oligonucleotides an die DNA ist auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Entweder bindet das Oligonucleotid an die doppelsträngig vorliegende DNA unter Bildung einer Triplehelix, oder die Bindung erfolgt an den Komplex aus Promoter und DNA, in welchem die doppelsträngige DNA aufgewunden wird. Im letzteren Fall kann ein Oligonucleotid komplementär zum zu transkribierenden Strang an die DNA binden [1]. Die Bindung des Platins an einer doppelsträngigen DNA unter Ausbildung eines metallmodifizierten Triplebasenpaares nach Hybridisierung eines mit der *trans*- $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$  - Spezies modifizierten Oligonucleotides über Triplehelixbildung wurde bereits gezeigt [23].

In bisherigen Arbeiten wurden Platinierungen stets nach erfolgter Oligonucleotidsynthese durchgeführt<sup>1</sup> [6][8][20][23][24][25][26]. Dies schränkt die Auswahl an möglichen Sequenzen für gezielte Platinierungen erheblich ein [23]. Führt man das bereits plattinierte Nucleosid direkt während der Oligonucleotidsynthese ein, sollte prinzipiell eine freie Variabilität der Oligonucleotidsequenz gegeben sein. Ziel der Arbeit und damit Arbeitsaufgabe war die Entwicklung von Methoden zur gezielten Einbindung von plattinierten Nucleosiden in einen DNA-Strang und die Synthese von plattinierten Oligonucleotiden, bei denen das Platinatom an der *trans* - Position zum koordinierten Nucleosid nach Hybridisierung zu einer Koordination am Gegenstrang befähigt ist.

---

<sup>1</sup> Im Zeitraum der Anfertigung dieser Arbeit erschien neben [61] eine weitere Publikation über die direkte Synthese eines plattinierten Oligonucleotides [57]. Hier wurde jedoch ausschließlich mit *cis*-Platinkomplexen gearbeitet.

## 2 Platinierung von Nucleosiden

Ausgangsstoff für Platinierungen zur Einführung der  $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$  - Spezies ist in der Regel *cis*- bzw. *trans*-Platin (**1b** bzw. **1a**). Die Bindungsaffinität von Liganden gegenüber Platin(II) nimmt in der Reihenfolge

$\text{CN}^- > \text{NH}_3 \approx \text{Gua}, \text{Ade}, \text{OH}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \approx \text{Phosphat}, \text{Carboxylat} > \text{H}_2\text{O} \geq \text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{ClO}_4^-$

ab und korreliert mit der Abgangstendenz der Liganden [22]. Der Mechanismus für die Substitution eines Liganden der quadratisch planaren Platin(II) - Komplexe verläuft über einen fünffach koordinierten Übergangszustand [27]. Die Platinierungen verlaufen dabei meist über den Schritt der „Aktivierung“ des *cis*- bzw. *trans*-Platins (**1b** bzw. **1a**) infolge einer Solvolysereaktion (Abb. 2), eine direkte Substitution der Chloroliganden z.B. durch Di- oder Triphosphate ist jedoch auch möglich [11].

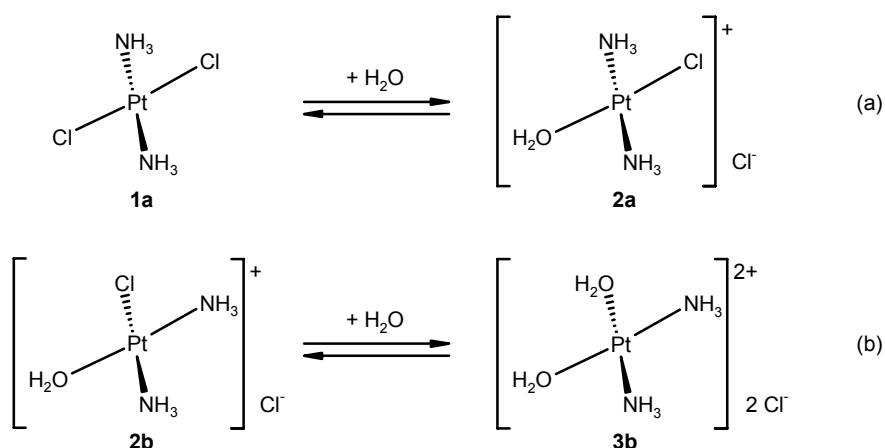


Abb. 2: Hydrolyse von *trans*-Platin **1a** (a) sowie zweite Hydrolysestufe von *cis*-Platin **1b** (b)

Ebenso wie *cis*-Platin **1b** hydrolysiert *trans*-Platin **1a** unter Austausch eines Chloroliganden gegen Wasser, dabei entsteht *cis*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$  **2b** bzw. *trans*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$  **2a** (Abb. 2a). Das Hydrolyseprodukt von *cis*-Platin **1b**, *cis*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$  **2b**, tauscht in einer zweiten, langsamer ablaufenden Hydrolysereaktion auch den zweiten Chloroliganden gegen ein Wassermolekül unter Bildung von *cis*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  aus (Abb. 2b) [22]. Im Gegensatz dazu wurde die Hydrolyse des zweiten Chloroliganden von *trans*-Platin **1a** nicht beobachtet, bis die Position des ersten wie in monofunktionalen *trans*-Diammin(DNA)chloroplatin(II) - Addukten besetzt ist [28].

Für diese „Aktivierung“ werden gewöhnlich zwei Methoden verwendet: Entweder wird der Metallkomplex in so viel Lösungsmittel gelöst, daß 50 % oder mehr des Komplexes im

Gleichgewichtszustand in der Solvolyseform vorliegen und (über Nacht) equilibriert, oder man setzt zu einem Chlorokomplex ein Äquivalent  $\text{AgNO}_3$  hinzu, incubiert bei  $37^\circ\text{C}$  und entfernt das  $\text{AgCl}$  durch Zentrifugation (Abb. 3) [22].

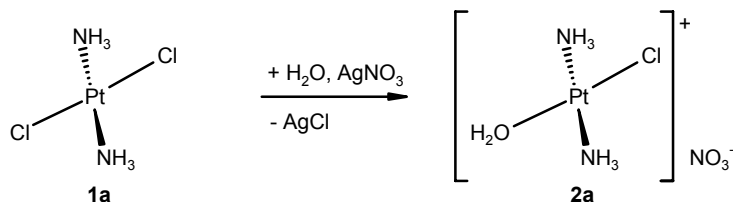


Abb. 3: „Aktivierung“ von *trans*-Platin durch Umsetzung mit  $\text{AgNO}_3$

Die Hydrolyse von Chloroplatincomplexen führt zu pH - abhängigen Gleichgewichten [22], das bei Hydrolyse von *trans*-Platin auftretende Gleichgewicht ist in Abb. 4 dargestellt.

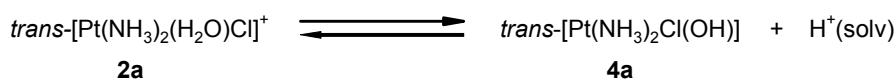


Abb. 4: pH - abhängiges Gleichgewicht zwischen *trans*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O)Cl}]^+$  **2a** und *trans*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl(OH)}]$  **4a**

Durch Deprotonierung des am Platinatom koordinierten Wassermoleküls von **2a** entsteht die betreffende Hydroxoplatinspezies, *trans*-Diamminchlorohydroxoplatin(II) **4a**. Die Reaktion von Hydroxoplatin(II) - Verbindungen mit unprotonierten Donorliganden wie Guanosin- $\text{N}^7$ , Adenosin- $\text{N}^7$  und - $\text{N}^1$  oder Cytidin- $\text{N}^3$  sind aufgrund der Reaktionsträgheit von Hydroxoplatin(II) - Gruppen hinsichtlich Substitution langsam (Abb. 5),

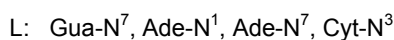
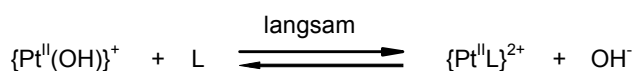


Abb. 5: Substitution des Hydroxoliganden der Hydroxoplatin(II) - Gruppe durch unprotonierte Donorliganden [11]

die Reaktion mit schwach sauren Gruppen ( $\text{N}^3\text{-H}$  von Thymidin und Uridin,  $\text{N}^1\text{-H}$  von Guanosin,  $4\text{-NH}_2$  von Cytidin) ist jedoch noch möglich (Abb. 6) [11].

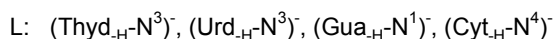
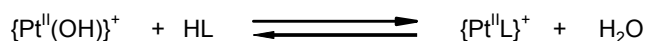


Abb. 6: Substitution des Hydroxoliganden der Hydroxoplatin(II) - Gruppe durch schwach saure Liganden [11]

Die Metallbindung an eine Nucleobase wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst (Basizität des Donors, sterische Wechselwirkungen, Wechselwirkungen zwischen den Liganden, Ladung und Hydrolysestadium des Metalls), bei Polynucleotiden werden die Ionenstärke der Lösung und bei Duplexnucleotiden sterische Verfügbarkeit zusätzlich bestimmend [11]. Für die  $\{\text{Pd}^{\text{II}}(\text{dien})\}^{2+}$  - Spezies werden die absoluten Stabilitätskonstanten der gebundenen Nucleoside, die mit denen gegenüber  $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{dien})\}^{2+}$  vergleichbar sind, entsprechend Abb. 7 angegeben [29].



Abb. 7: Reihenfolge der absoluten Stabilitätskonstanten für die an der  $\{\text{Pd}^{\text{II}}(\text{dien})\}^{2+}$  - Spezies gebundenen Nucleoside bei pH = 7 [29]

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, werden die Nucleoside mit Pyrimidinbasen hauptsächlich an der  $\text{N}^3$  - Position platinert. Eine besonders hohe thermodynamische Stabilität haben Platin(II) - Komplexe von  $\text{N}^3$  platinertem Thymidin und Uridin [11][30]. Durch die Platinierung an der  $\text{N}^3$  - Position erhöht sich die Basizität dieser Liganden gegenüber den neutralen Nucleosiden. Deutlich verschieden ist die Situation bei den platinerten neutralen Nucleosiden (Gua, Ade, Cyt), wo die Platinkoordination die NH - Acidität erhöht ( $\text{N}^1\text{-H}$  bei Gua, 6-NH bei Ade und 4-NH bei Cyt) und die Basizität der  $\text{N}^1$  - Position bei  $\text{N}^7$  - platinertem Ade verringert wird.

Nucleoside mit Purinbasen haben im Unterschied zu denen mit Pyrimidinbasen mehrere wichtige Bindungsseiten für Platin(II). Adenosin wird nur in stark saurem Medium selektive an der  $\text{N}^7$  - Position platinert, Guanosin dagegen wird auch unter neutralen pH - Bedingungen bevorzugt an der  $\text{N}^7$  - Position platinert [11]. Im pH - Bereich von 5 - 6 erhält man  $\text{N}^1$  - ,  $\text{N}^7$  - und an beiden Seiten zweifach platinerte Adenosinkomplexe [11]. Die Koordination von Platin(II) an der  $\text{N}^1$  - Position von Guanosin kann entweder in neutraler oder schwach alkalischer Lösung mit einem Überschuß an Platinelektrophilen oder aber in stark alkalischer Lösung (pH = 10.5) auftreten [11]. Im ersten Fall werden gewöhnlich  $\text{N}^7, \text{N}^1$  - zweifach platinerte Produkte, im zweiten Fall Mischungen aus  $\text{N}^7$  - platinerten,  $\text{N}^1$  - platinerten und  $\text{N}^7, \text{N}^1$  - zweifach platinerten Produkten erhalten.

### 3 Syntheseverfahren für Oligonucleotide

Die Synthese von Oligonucleotiden kann auf verschiedenen Synthesewegen erfolgen, gebräuchlich sind das Phosphotriester - Verfahren, das H-Phosphonat - Verfahren sowie das Amidit - oder Phosphittriestern - Verfahren [31][32]. Bei all diesen Verfahren erfolgt die Synthese des Oligonucleotides von 3'  $\rightarrow$  5'.

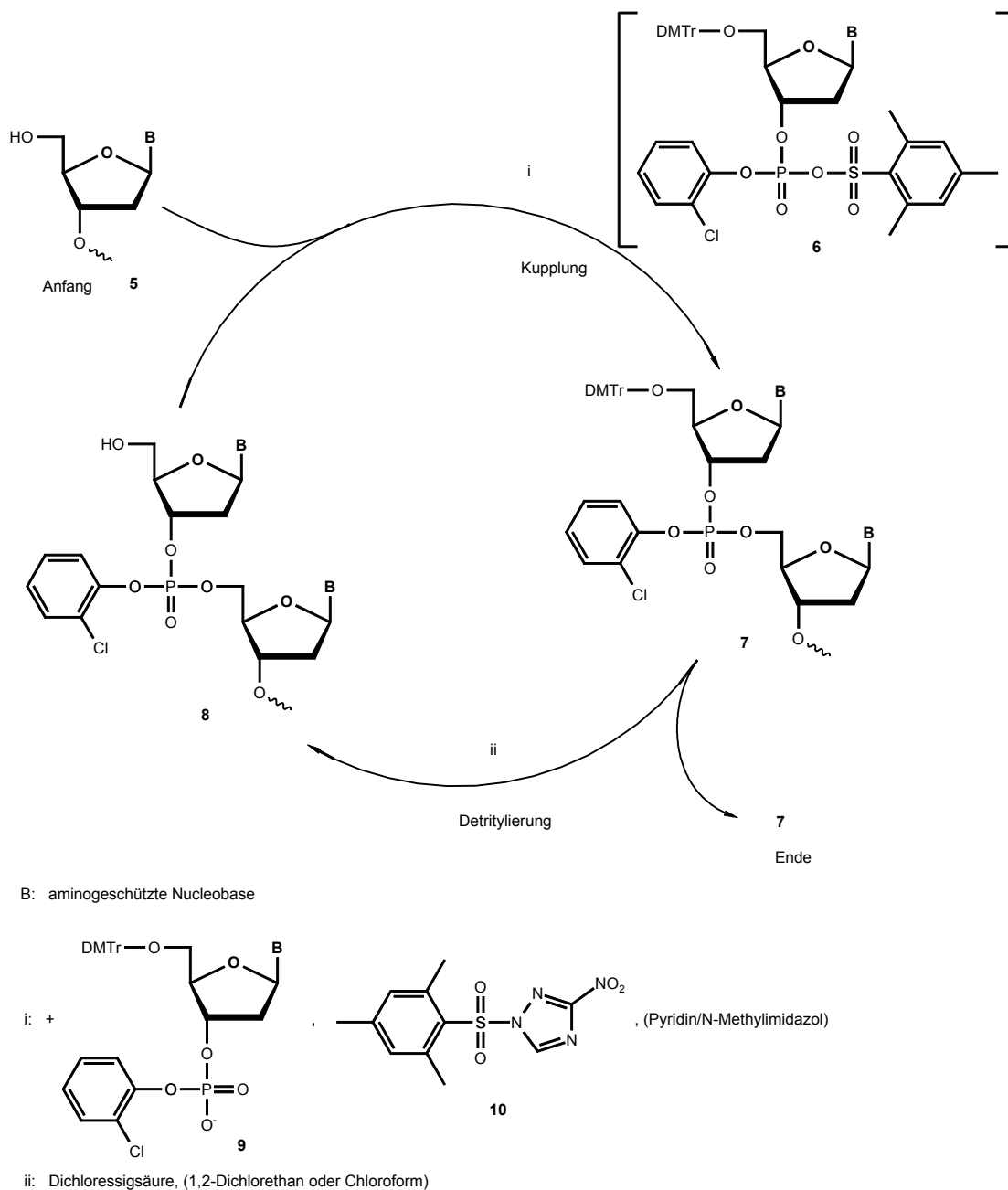


Abb. 8: Phosphotriester - Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden

Das Reaktionsschema des Phosphotriester - Verfahrens ist in Abb. 8 dargestellt. Das erste Nucleosid **5** (am 3'-Ende des zu synthetisierenden Oligonucleotides) wird bei Durchführung

einer Festphasensynthese über die 3'-Hydroxyfunktion an einen festen Träger basisch abspaltbar angebunden, anderenfalls wird die 3'-Hydroxygruppe mit einer basisch abspaltbaren Gruppe (z.B. mit der Benzoylschutzgruppe) geschützt. Die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen müssen gleichfalls basisch abspaltbar geschützt werden, in der Regel verwendet man die Benzoyl - bzw. die Isobutyrylgruppe. Die 5'-OH - Gruppen der zur Kupplung einzusetzenden Nucleosid-3'-(2-chlorphenyl)phosphate **9** müssen mit einer sauer abspaltbaren Gruppe geschützt werden, üblich sind Dimethoxytrityl und Monomethoxytrityl. Die Umsetzung des Nucleosid-3'-(2-chlorphenyl)phosphates **9** mit dem Sulfonsäurederivat (Mesitylensulfonyl-(3-nitro)-1,2,4-triazolid **10**, 2,4,6-Triisopropylbenzen-sulfonsäurechlorid) führt zur Bildung eines gemischten Säureanhydrides **6**, welches mit der Hydroxygruppe unter Bildung eines Phosphotriesters **7** kuppelt. Wird die Synthese in Lösung durchgeführt, kann die Abtrennung des Produktes nach der Kupplungsreaktion durch Extraktion erfolgen, nach jeder Detritylierung mit Dichloressigsäure in Chloroform oder Dichlorethan ist eine säulenchromatographische Reinigung erforderlich. Für die Synthese von längeren Oligonucleotiden ist die Variante der Festphasensynthese daher vorzuziehen. Die Abspaltung aller Schutzgruppen, d.h. der Schutzgruppen der exocyclischen Aminogruppen und der 2-Chlorphenyl - Schutzgruppen an den Phosphatgruppen sowie ggf. die Abspaltung vom festen Träger (zusammengefaßt auch Entblockung genannt) erfolgt am Ende der Oligonucleotidsynthese. Im Gegensatz zu dem H-Phosponat - und dem Amidit - Verfahren muß die 5'-Hydroxygruppe des synthetisierten Oligonucleotides geschützt bleiben, bis die 2-Chlorphenyl - Schutzgruppen abgespalten wurden, andernfalls kommt es über ein cyclisches Phosphat - Intermediat zur Bildung von 5' → 5' - verknüpften Oligonucleotiden [33]. Die Entblockung wird in drei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt werden die 2-Chlorphenylgruppen mit syn-2-Nitrobenzaloxim und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in wäßrigem Dioxan entfernt und ggf. das Oligonucleotid vom festen Träger abgespalten, nach Einrotieren der Lösung werden in einem zweiten Schritt die N-Acyl - Schutzgruppen mit konz. wäßriger Ammoniaklösung entfernt, in dem dritten und letzten Schritt der Entblockung wird die Trityl - Schutzgruppe an der 5'-Position abgespalten [33]. Alternativ können die ersten beiden Schritte auch in einem Schritt mit Natronlauge durchgeführt werden [34]. Wichtigste Nebenreaktion der Phosphotriester - Methode ist die Sulfonierung der 5'-OH - Gruppe, dies begrenzt die maximale theoretische Ausbeute an Kupplungsprodukt auf 97 - 98 %, die maximale Länge eines so synthetisierten Oligonucleotides beträgt etwa 40 [31]. Dieses Verfahren wird vor allem für große Reaktionsansätze genutzt [31].

Im Gegensatz zum Phosphotriester - Verfahren, bei welchem der Phosphor in den einzusetzenden Nucleosid-3'-(2-chlorphenyl)phosphaten **9** die Oxidationsstufe V aufweist, ist die Oxidationsstufe des Phosphors in den Nucleosid-3'-H-phosponaten **15**, die für das H-Phosponat - Verfahren verwendet werden, III. Die daher notwendige Oxidation des Phosphors erfolgt jedoch erst am Ende der Oligonucleotidsynthese (Abb. 9), eine Schutzgruppe an der Phosphorgruppierung ist deshalb nicht erforderlich. Der Schutz der



exocyclischen Aminogruppen ist nicht notwendig [35], da der Schutz der Aminogruppen jedoch zur Modifizierung bzw. zum Schutz der Hydroxygruppen des Zuckers notwendig ist, werden die Schutzgruppen der exocyclischen Aminogruppen häufig nicht entfernt [36]. Die Aktivierung der H-Phosphonat - Gruppe erfolgt durch Pivaloylchlorid **16** oder Adamantanoylchlorid, analog zu dem Phosphotriester - Verfahren entsteht auch hier ein gemischtes Säureanhydrid **11**, welches mit der 5'-Hydroxygruppe des bereits synthetisierten Oligomers unter Bildung eines Phosphondiester **12** kuppelt (Abb. 9).

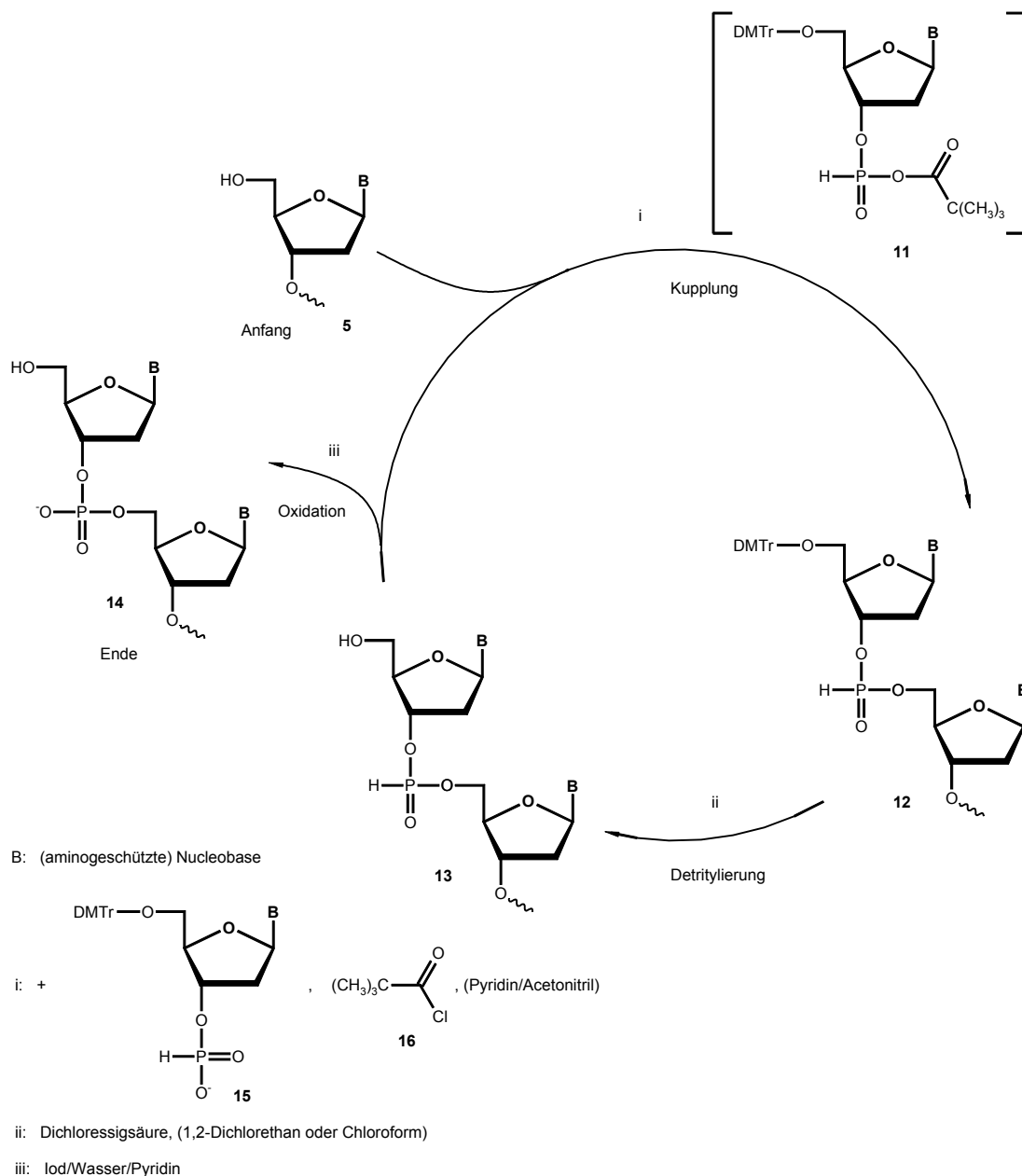


Abb. 9: H-Phosphonat - Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden

Die Ausbeuten pro Kupplungsschritt betragen 97 - 99 % und sind entscheidend von der Reinheit des verwendeten Pyridins abhängig [37]. Die Entblockung des Oligonucleotides erfolgt in der Regel mit konz. wäßriger Ammoniak - Lösung, kann aber auch mit Natronlauge

erfolgen. Das Vormischen von Nucleosid-H-phosphonat **15** und Pivaloylchlorid **16**, d.h. das Mischen von Nucleosid-H-phosphonat **15** und Pivaloylchlorid **16** ohne Zugabe der Hydroxykomponente, führt in Gegenwart einer Base infolge Acylierung des entstandenen gemischten Säureanhydrides **11** zum entsprechenden Diacylphosphit **17**, welches dann mit der Hydroxyverbindung unter Bildung des entsprechenden Phosphittriesters **18** reagiert, weiterhin entsteht das entsprechende Acylphosphondiester **20** (Abb. 10) [38][39][40]. Um diese Nebenreaktionen zu vermeiden, muß das Kupplungsprotokoll so ausgearbeitet sein, daß ein Vormischen von Nucleosid-H-phosphonat **15** und Pivaloylchlorid **16** nicht erfolgt.

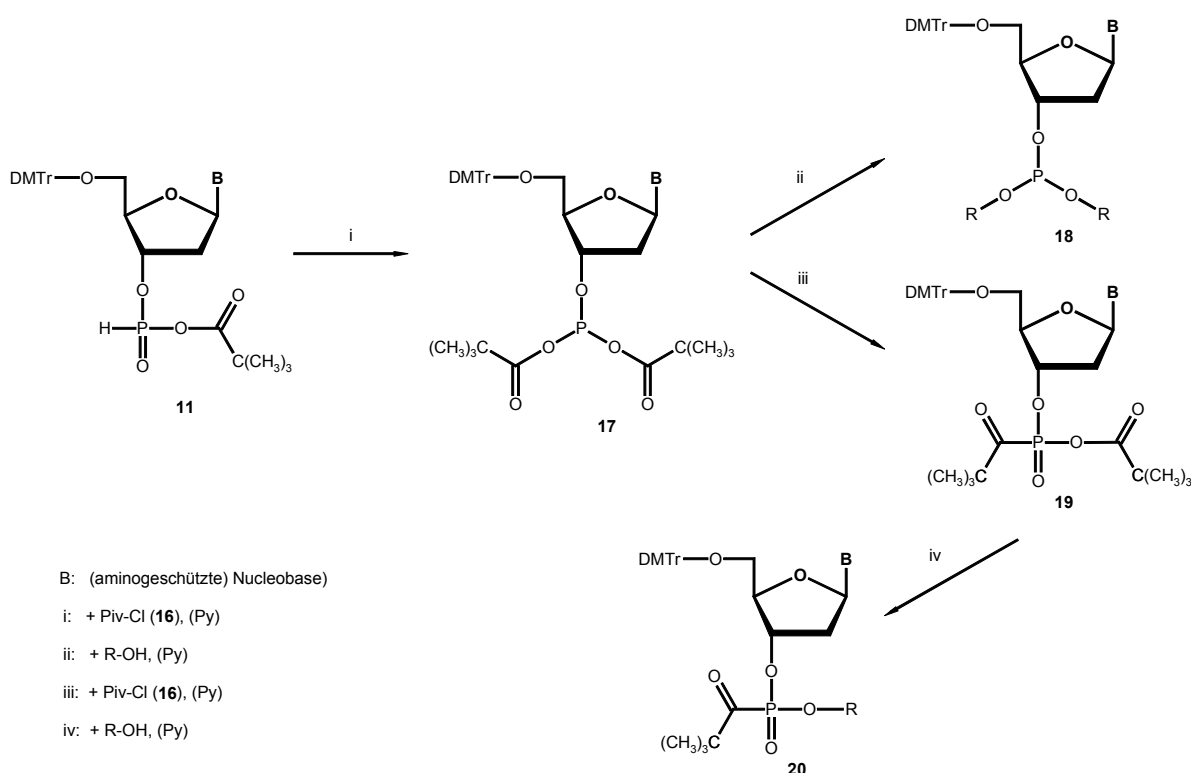


Abb. 10: Mögliche Nebenreaktionen des H-Phosphonat - Verfahrens infolge Bildung von Diacylphosphit (**17**) [40]

Das H-Phosphonat - Verfahren ist sowohl für kleine als auch für größere Reaktionsansätze geeignet [31].

Wie bei dem H-Phosphonat - Verfahren hat die kupplungsfähige Phosphorgruppe bei den für das Amidit - Verfahren einzusetzenden Nucleosidphosphoramiditen **26** die Oxidationsstufe III. Im Unterschied zum H-Phosphonat - Verfahren muß hier jedoch nach jeder Kupplung die Oxidation zum fünfwertigen Phosphor erfolgen, da die entstehenden Phosphorigsäuretriesters **22** (Phosphittriesters) über ein freies Elektronenpaar am Phosphor verfügen, das elektrophil angegriffen werden kann. Analog dem Phosphotriester - Verfahren müssen die Nucleobasen vollständig geschützt sein. Im Kupplungsschritt erfolgt die Aktivierung des Phosphoramidites **26** durch Reaktion mit dem schwach aciden 1H-Tetrazol **27**, dabei entsteht das reaktive



darüber, das Phosphoramidit - Verfahren wird jedoch nur für kleine Reaktionsansätze verwendet [31].

## 4 Synthesestrategien

Zwei prinzipielle Zielstrukturen entsprechend der Aufgabenstellung sind denkbar. Einerseits sind dies Oligonucleotide mit monofunktionaler Anbindung eines *trans*-Platin - Komplexes, der in *trans* - Stellung zur Anbindung an das Oligonucleotide eine Abgangsgruppe, z.B. Chlorid, enthält (**Zielstruktur 1**, Abb. 14). Andererseits sollte ein Oligonucleotid mit einer entsprechend Abb. 1 analogen zweifachen Anbindung einer *trans*-Platin - Spezies (**Zielstruktur 2**, Abb. 12) in vergleichbarer Weise der Reaktion der Doppelhelix - unterstützten Isomerisierung eines *1,3-intrastrand-crosslinks* einer *trans*-Platin - Spezies zu einem platinmodifizierten Basenpaar (vgl. Abschnitt 1) zugänglich sein. Da zu erwarten ist, daß die Abgangsgruppe des Platinkomplexes eines synthetisierten platinmodifizierten Oligonucleotides mit einer Abgangsgruppe in der Koordinationssphäre des Platins (**Zielstruktur 1**) während der notwendigen Entblockung (vgl. Abschnitt 3) und Reinigung gegen Wasser und andere Gruppen oder Moleküle (z.B.  $\text{NH}_3$ ) austauscht, was ungewollte Reaktionen zur Folge hätte, muß diese Position durch Koordination eines stabilen Liganden, der unter geeigneten Bedingungen wieder austauschen kann, geschützt werden. Hier erscheint es besonders sinnvoll, dies durch die Ausbildung eines stabilen *intrastrand-crosslinks* noch vor der Entblockung zu realisieren (Reaktion (i), Abb. 12).

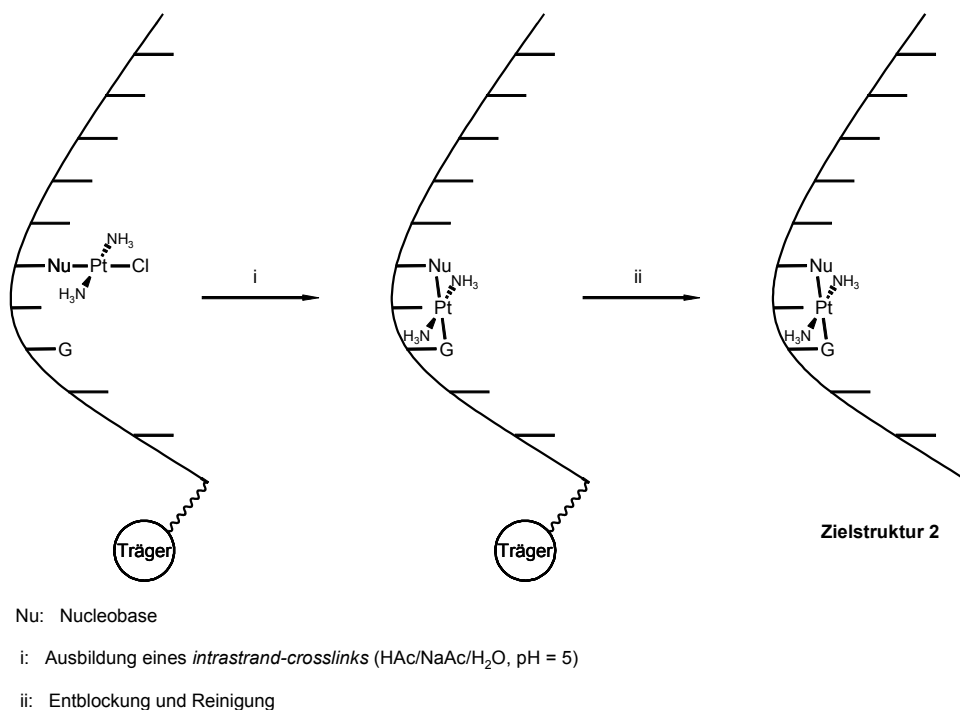


Abb. 12: Ausbildung eines *intrastrand-crosslinks*

Nach Entblockung und Reinigung sollte dann direkt **Zielstruktur 2** erhalten werden (Abb. 12). Die Ausbildung des *intrastrand-crosslinks* ist jedoch nicht ganz unproblematisch. Unter

sauren Bedingungen (im pH - Bereich von 3 - 5) kann man die N<sup>7</sup> - Position der Purinbasen selektiv platinieren (unter diesen Bedingungen ist Cytosin weitestgehend protoniert, Thymidin wird unter diesen Bedingungen nicht platinert, vgl. auch Abschnitt 1). Guanosin wird bevorzugt platinert [11][41]. Da die Stabilität von N<sup>7</sup> - platinerten Guanosinderivaten deutlich größer als die der entsprechenden Adenosinderivate ist (Abschnitt 1), erscheint die N<sup>7</sup> - Position von Guanosin hier als besonders sinnvoll. Eine weitere Einschränkung der Möglichkeiten zur Ausbildung verschiedener *crosslinks* kann durch die Wahl des geeigneten Zeitpunktes, d.h. Unterbrechung der Oligonucleotidsynthese, geschehen. Erfolgt z.B. die Reaktion zur Ausbildung eines *intrastrand-crosslinks* direkt nach dem Einbau des platinerten Thymidins, kann die Ausbildung eines *intrastrand-crosslinks* nur in 3'-Richtung erfolgen. Bei Unterbrechung der Oligonucleotidsynthese ist es allerdings notwendig, den bereits synthetisierten Abschnitt zu oxidieren. Phosphonsäurediester (z.B. **13**) werden in wäßriger Lösung unter basischen Bedingungen sehr rasch hydrolysiert, doch auch in saurer Lösung werden Phosphonsäuredialkylester bei 25°C noch um etwa eine Größenordnung schneller hydrolysiert als das entsprechende Phosphorsäuretrialkylester bei 100°C [42]. Weiterhin werden Phosphonsäurediester im Gegensatz zu Phosphonsäuremonoester (H-Phosphonate) bereits in schwach basischer Lösung leicht oxidiert [42][43], eine Redoxreaktion des Phosphors (Oxidationsstufe III) mit Platin (II) wäre prinzipiell denkbar, findet aber in der Regel nicht statt, da dreiwertige Phosphorverbindungen (mit verfügbarem Elektronenpaar) fest an Platin(II) koordinieren. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen während der weiteren Oligonucleotidsynthese muß die Oxidation unter Ausbildung eines Phosphorsäuretriesters **25** erfolgen. Diese Reaktion ist in der Literatur beschrieben (Abb. 13a) [44].

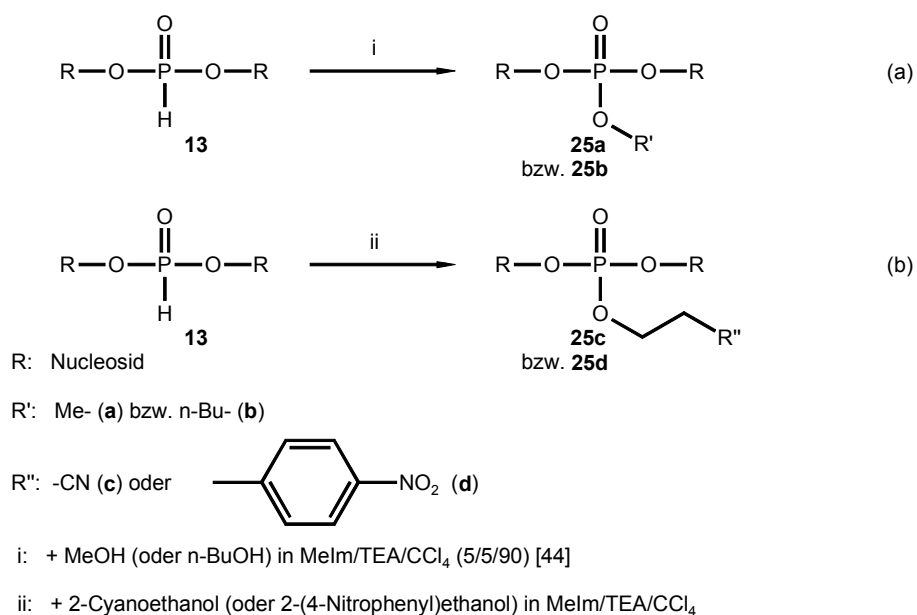


Abb. 13: Oxidation eines Phosphonsäurediesters (**13**) unter Bildung eines Phosphorsäuretriesters (**25**)

Verwendet man nun ein Alkohol, das an 2-Position eine elektronenziehende Gruppe trägt, sollte sich das entsprechende Phosphorsäuretriester **25** bilden, welches sich unter basischen Bedingungen gezielt zersetzen läßt (Abb. 13b, vgl. Abschnitt 1). Beachtet werden muß dabei, daß das H-Phosphonat - Verfahren in basischer Lösung (Py/AN = 1/1, vgl. Abschnitt 1) durchgeführt wird, eine Zersetzung bereits unter den Bedingungen der H-Phosphonat - Synthese muß ausgeschlossen werden. 2-Cyanoethyl-H-phosphonat ist als effektives Capping - Reagenz beschrieben [45], gleichfalls wurde es zur Phosphorylierung von Nucleotiden eingesetzt [46], auch 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-H-phosphonat wurde unter den Bedingungen der H-Phosphonat - Synthese eingesetzt [47]. Als Alkohole sollten demnach 2-Cyanoethanol bzw. 2-(4-Nitrophenyl)ethanol geeignet sein (Abb. 13b). Für die Abspaltung der 2-(4-Nitrophenyl)ethyl - Gruppe muß jedoch (zusätzlich oder im Gemisch mit konz. Ammoniaklösung) DBU verwendet werden [47]. Trotz dieser Varianten zur gezielten Einschränkung der Möglichkeiten zur Ausbildung unerwünschter *crosslinks* kann die Entstehung von weiteren, d.h. ungewollten *crosslinks*, vor allem von *interstrand-crosslinks*, nicht ausgeschlossen werden.

Ein sehr wichtiger Aspekt bei der Realisierung der direkten Synthese von platinieren Oligonucleotiden ist die ausreichende Stabilität der vor der Oligonucleotidsynthese durchgeführten Platinierung. Wie aus Abschnitt 1 hervorgeht, erscheinen die Nucleoside Guanosin und Thymin bzw. Uridin in dieser Hinsicht als besonders geeignet. Da die Stabilitäten von N<sup>3</sup> - platinierem Thymin und N<sup>3</sup> - platinierem Uridin recht ähnlich sind [30] und zur Untersuchung Oligodesoxynucleotide herangezogen werden sollten, wird hier nur noch N<sup>3</sup> - platinierem Thymin betrachtet, ein späteres Ersetzen von Thymin durch Uridin im Falle der Verwendung von Oligoribonucleotiden sollte keine größeren Probleme aufwerfen. Ein weiterer günstiger Gesichtspunkt ist die Tatsache, daß Thymin unter basischen Bedingungen selbst platinier wird (vgl. Abb. 4 und Abb. 6), eine Deplatinierung bzw. eine Wanderung der Platinspezies zu einer anderen Platinierungsposition des Nucleotides während der basischen Entblockung des Oligonucleotides kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden. Ein dritter Punkt, der für Thymin spricht, ist die Möglichkeit, Thymin unter sauren Bedingungen in Gegenwart eines geeigneten Liganden wie z.B. Cl<sup>-</sup> wieder zu deplatinieren [48][49]. Dies eröffnet die Möglichkeit, N<sup>3</sup> - platinierem Thymin selektiv zu deplatinieren [50]. So ist es möglich, ein *intrastrand-crosslink*, das zum Schutz der noch verfügbaren Koordinationsstelle am Platin vor der Entblockung des Oligonucleotides gebildet wurde, nach Entblockung und Isolierung des platinieren Oligonucleotides wieder so zu öffnen, daß erneut eine verfügbare Koordinationsstelle an dem Platinkomplex entsteht (Abb. 14). Die in Abb. 14 schematisch dargestellte Reaktion für ein *1,3-intrastrand-crosslink* ist auch denkbar, wenn die beiden platinieren Nucleobasen weiter entfernt sind, d.h. wenn z.B. ein *1,4-intrastrand-crosslink* vorliegt.

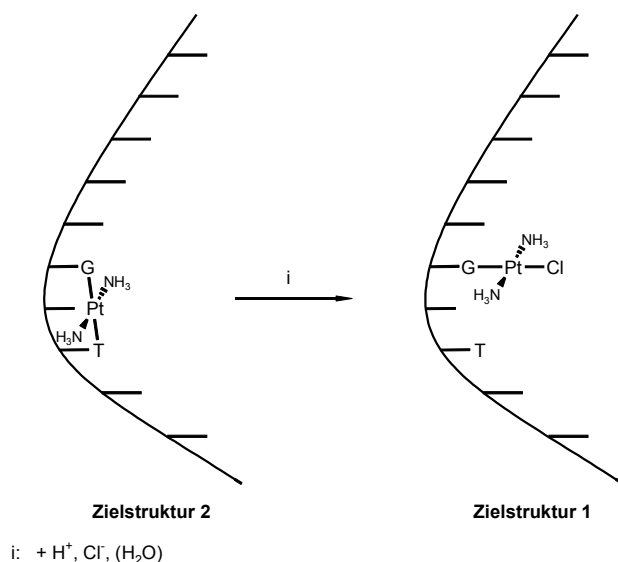


Abb. 14: Prinzip der Umwandlung eines Oligonucleotides mit *intrastrand-crosslink* in der platinieren Sequenz d(GNT) bzw. d(TNG) (N = A, C, G, T) in ein Oligonucleotid mit monofunktionaler Platinanbindung (**Zielstruktur 1**)

Als weiteres mögliches Nucleosid zur Platinierung wird neben Thymidin auch 2'-Desoxyguanosin angesehen (vgl. Abschnitt 1). Hier ist sowohl die N<sup>1</sup>- als auch die N<sup>7</sup>-Position zur Platinierung interessant, von besonderem Interesse ist die N<sup>1</sup>-Position, da diese durch nachträgliche Platinierung von Oligonucleotiden (ebenso wie die N<sup>3</sup>-Position von Thymidin) aufgrund vieler zu erwartender Nebenreaktionen kaum zugänglich ist.

Der zweite sehr wichtige Aspekt bei der Realisierung der direkten Synthese von platinieren Oligonucleotiden ist die Auswahl des Syntheseverfahrens für Oligonucleotide. Alle drei gebräuchlichen Syntheseverfahren sind in Abschnitt 1 zur Übersicht dargestellt. Für das Phosphoramidit - Verfahren spricht die hohe Kupplungsausbeute, dagegen sprechen die geringe Stabilität der Phosphoramidite (sehr schnelle Zersetzung selbst in sehr schwach saurer Lösung) sowie eine mögliche Koordination der Phosphoramidite über das am Phosphor verfügbare freie Elektronenpaar. Im Gegensatz dazu ist weder von Nucleosid-3'-(2-chlorphenyl)phosphaten **9** noch von Nucleosid-3'-H-phosphonaten **15** eine (feste) Koordination an Platin(II) zu erwarten. Nachteil sowohl des H-Phosphonat - als auch des Phosphotriester - Verfahrens ist die Verwendung von Pyridin als Bestandteil des Lösungsmittels (Abschnitt 1), da Pyridin an Platin(II) fest koordiniert [51]. Pyridin sollte sich jedoch ggf. durch eine andere, an Platin(II) nicht oder nur schlecht koordinierbare Base ersetzen lassen. Phosphonsäuremonoester (H-Phosphonate) werden nur von starken Oxidationsmitteln oxidiert [36], d.h. auch eine Redoxreaktion der H-Phosphonate mit Platin(II) ist nicht zu erwarten. Ein Nachteil des Phosphotriester - Verfahrens ist die kompliziertere Prozedur der Entblockung (Abschnitt 1), ein weiterer Vorteil des H-Phosphonat - Verfahrens neben der chemischen Beständigkeit der H-Phosphonate ist die Tatsache, daß ein Schutz der exocyclischen Aminogruppen (d.h. der Nucleobasen) nicht



notwendig ist (Abschnitt 1). Dies ist im Hinblick auf die Platinierung der betreffenden Nucleobase von Vorteil. Aus diesen Gründen wurde zur Synthese der platinieren Oligonucleotide das H-Phosphonat - Verfahren ausgewählt. Es sollte jedoch auch die Möglichkeit der Verwendung von Phosphoramiditen zur Einführung eines platinieren Nucleosides während der Oligonucleotidsynthese überprüft werden.

In Abb. 15 ist die Synthesestrategie des Synthesebausteines „Pt-T“ (**29a**) zur Einführung von  $trans\text{-}\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$  - modifiziertem Thymidin während der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren dargestellt.

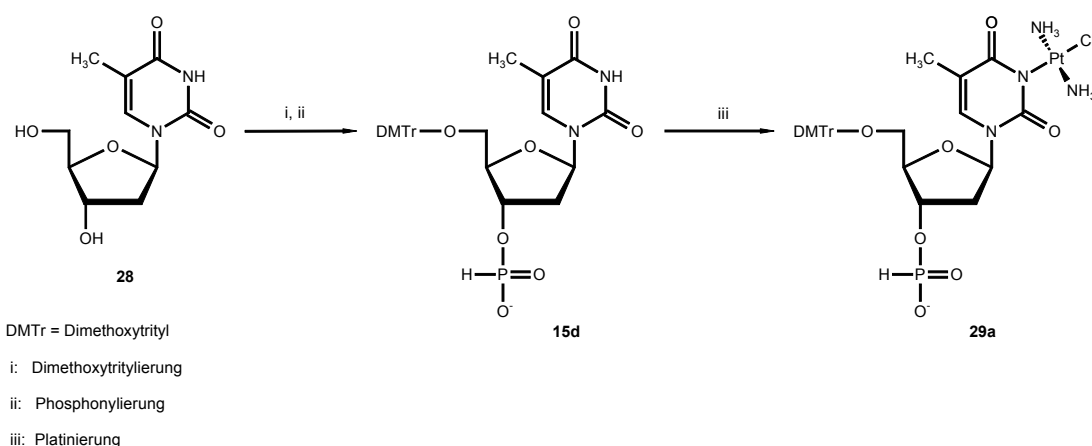


Abb. 15: Synthesestrategie des Synthesebausteines „Pt-T“ zur Einführung von  $trans\text{-}\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$  - modifiziertem Thymidin während der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren

Ausgehend von Thymidin (**28**) wird erst die 5'-Hydroxyfunktion mit der Dimethoxytrityl - Gruppe geschützt, nachfolgend die 3'-Hydroxyfunktion phosphonyliert. Das erhaltene O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**) sollte stabil genug sein, platinieren zu werden.

Diese Strategie läßt sich prinzipiell auch auf die Synthese eines analogen Synthesebausteines „Pt-G“ anwenden (Abb. 16). Zu Beginn der Synthese muß jedoch die exocyclische Aminogruppe an 2-Position geschützt werden. Während der Phosphonylierung der 3'-Hydroxyfunktion kann eine Nebenreaktion an der O<sup>6</sup>-Position auftreten [52], ggf. sollte dies durch Variation der Schutzgruppe der exocyclische Aminogruppe zu vermeiden sein. Alternativ dazu ist es möglich, die H-Phosphonat - Gruppe indirekt einzuführen. Hierbei wird mit 2-Cyanoethyl-H-phosphonat das entsprechende Phosphondiester synthetisiert, das anschließend mit DBU in Acetonitril zum Nucleosid-H-phosphonat zersetzt wird [53]. Die Platinierung an der N<sup>7</sup>-Position sollte bereits in schwach saurer wäßriger Lösung selektive möglich sein (vgl. Abschnitt 1), hier muß beachtet werden, daß die Dimethoxytrityl - Gruppe unter sauren Bedingungen leicht abgespalten wird. Die Platinierung der N<sup>1</sup>-Position erfolgt

unter basischen Bedingungen (vgl. Abschnitt 1). Vor der Platinierung kann die Schutzgruppe der exocyclischen Aminogruppe ggf. entfernt werden.

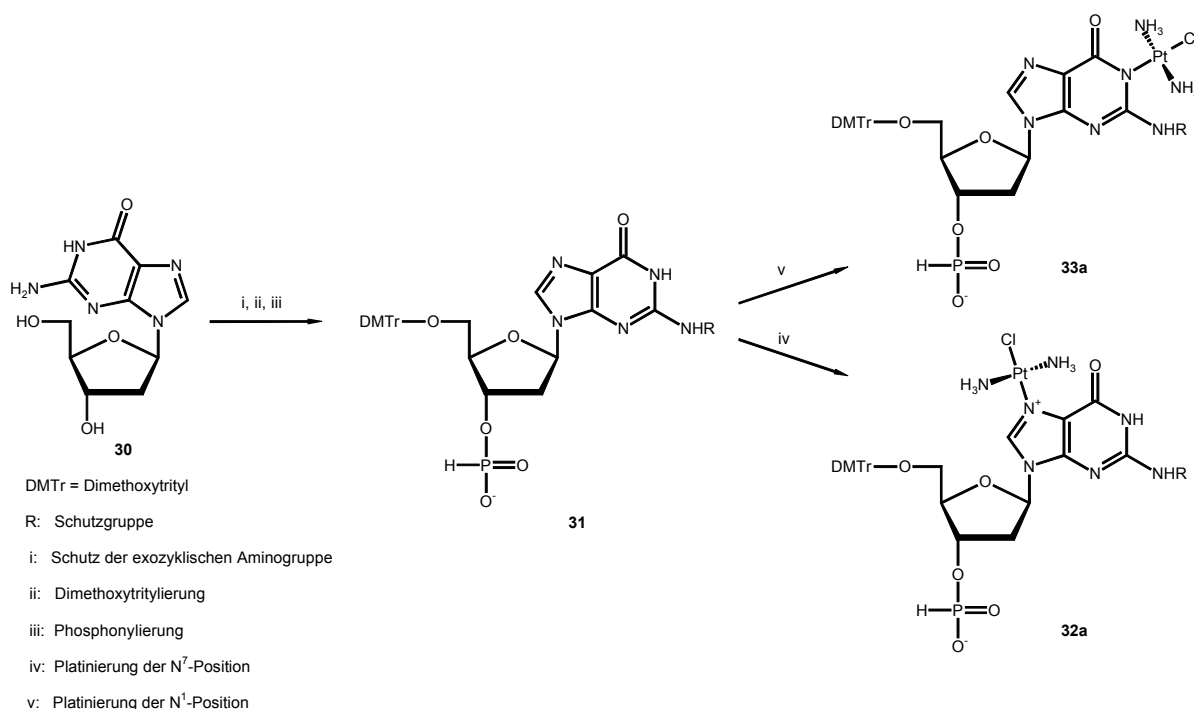


Abb. 16: Synthesestrategien von zwei Varianten des Synthesebausteines „Pt-G“ zur Einführung von  $trans\text{-}\{Pt^{II}(NH_3)_2Cl\}^+$ -modifiziertem 2'-Desoxyguanosin während der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren

Wie bereits erwähnt wurde, sollte auch die Möglichkeit untersucht werden, platinierter Nucleosidphosphoramidite zu synthetisieren. Die Variante der Platinierung eines Phosphoramidites scheidet aufgrund der geringen Stabilität der Phosphoramidite aus, daher kann nur die Phosphitylierung einer platinierter Verbindung in Betracht gezogen werden (Abb. 17).

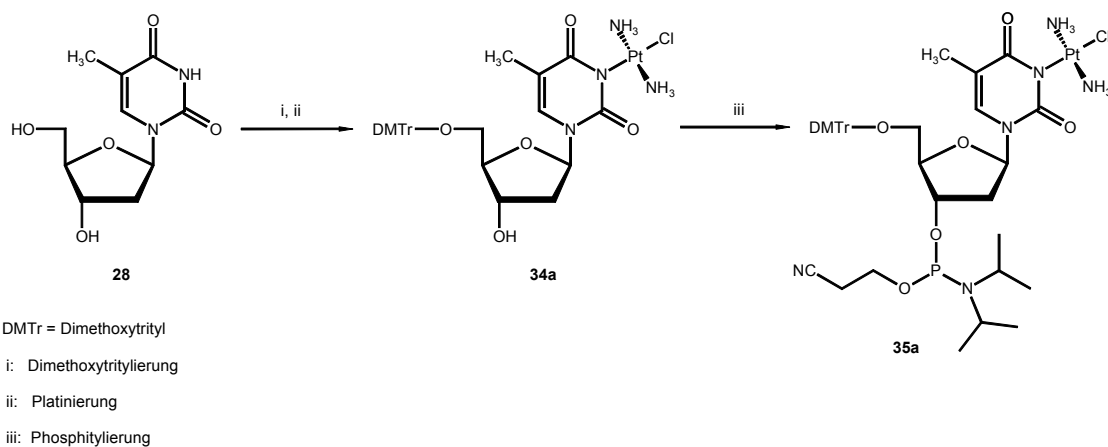


Abb. 17: Strategie der Synthese des N<sup>3</sup>-platinierter O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityliertem Thymidin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidites **35a** zur Einführung von  $trans\text{-}\{Pt^{II}(NH_3)_2Cl\}^+$ -modifiziertem Thymidin während der Oligosynthese nach dem Phosphoramidit - Verfahren

Eine andere Herangehensweise ist in Abb. 18 dargestellt. Hier wird das platiniierte Nucleosid an einen festen Träger angebunden und dient als Startnucleosid für die Oligonucleotidsynthese.

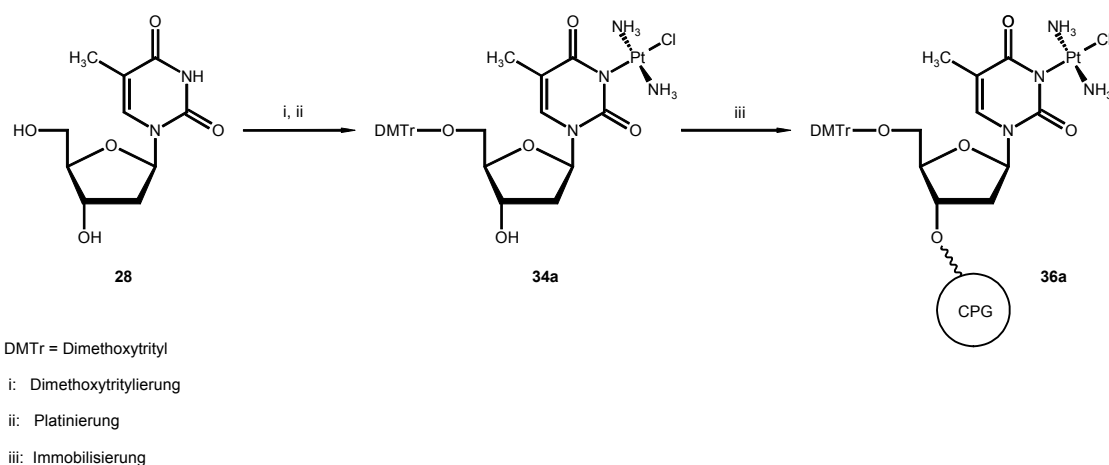


Abb. 18: Strategie der Synthese von CPG - gebundenem  $trans\text{-}\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$  - modifiziertem O<sup>5'</sup>-dimethoxytritylierten Thymidin

Dies beschränkt die Position des platiniierten Nucleosides auf das 3'-Ende, andererseits werden so mögliche Probleme während der Kupplung des platiniierten Nucleosides umgangen. Da die Platinierung von Thymidin unter basischen Bedingungen durchgeführt werden muß (vgl. Abschnitt 1), die Trägeranbindung dagegen eine basische Abspaltbarkeit erfordert, ist es sinnvoll, die Platinierung vor der Immobilisierung durchzuführen.

Bei allen Strategien ist es erforderlich, noch vor der Entblockung des synthetisierten platiniierten Oligonucleotides, die in wäßriger Lösung durchzuführen ist (vgl. Abschnitt 1), den reaktiven Chloroliganden gegen einen unter den Bedingungen der Entblockung und chromatographischen Reinigung stabilen Liganden auszutauschen. Dies sollte wie bereits erläutert durch Bildung eines *intrastrand-crosslinks* zur N<sup>7</sup>-Position eines Guanins möglich sein. So hergestellte 1,3-*intrastrand-crosslinks* sollten dann (bei entsprechender Länge) entsprechend dem in Abb. 1 dargestellten Prinzip grundsätzlich reagieren können. Wird platiniiertes Thymidin in das Oligonucleotid eingeführt, kann alternativ das in Abb. 14 dargestellte Prinzip angewendet werden.

## 5 Untersuchungen zur Synthese und Ankupplung von Platin - Komplexen an Oligonucleotide nach dem Phosphoramidit - Verfahren

### 5.1 Untersuchung der Synthese eines platinieren Nucleosidphosphoramidit - Monomers

Da das Amidit - Verfahren das gebräuchlichste Verfahren zur Festphasensynthese von Oligonucleotiden ist, sollte dieser Weg untersucht werden (vgl. Abschnitt 4). Für die Verwendung des Amidit - Verfahrens ist die Synthese eines platinieren Nucleosid - Phosphoramidites erforderlich. Obwohl die *Lewis* - Acidität des Platins die Synthese eines platinieren Nucleosid - Phosphoramidites aufgrund der sehr großen Säurelabilität von Phosphoramiditen zusätzlich kompliziert macht, sollte dieser Weg versucht werden. *Krizanovic et al.* publizierten eine Vorschrift für die Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(1-MeT<sub>H</sub>)] (**38a**) in DMF (Abb. 19) [10].

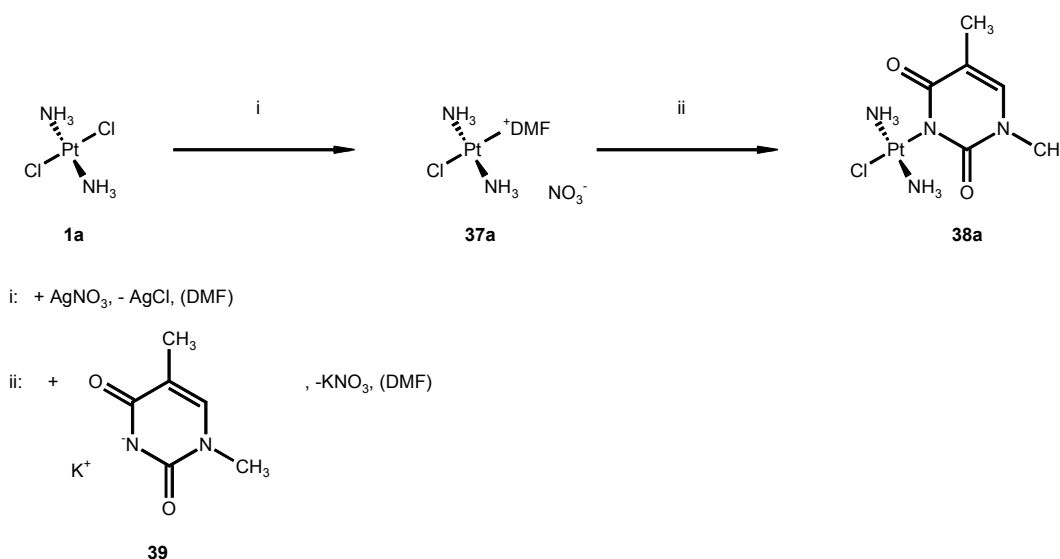


Abb. 19: Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(1-MeT<sub>H</sub>)] (**38a**) in DMF nach [10]

Die Platinierung eines Alkalisalzes der Nucleobase Thymin in DMF wurde aufgegriffen, anders als in dieser Vorschrift wurde *trans*-Platin (**1a**) jedoch direkt mit Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat (**41**) in DMF umgesetzt (Abb. 20). O<sup>5'</sup>-DMTr-Thymidin (**40**) wurde entsprechend Abb. 31 (Reaktion i) synthetisiert.

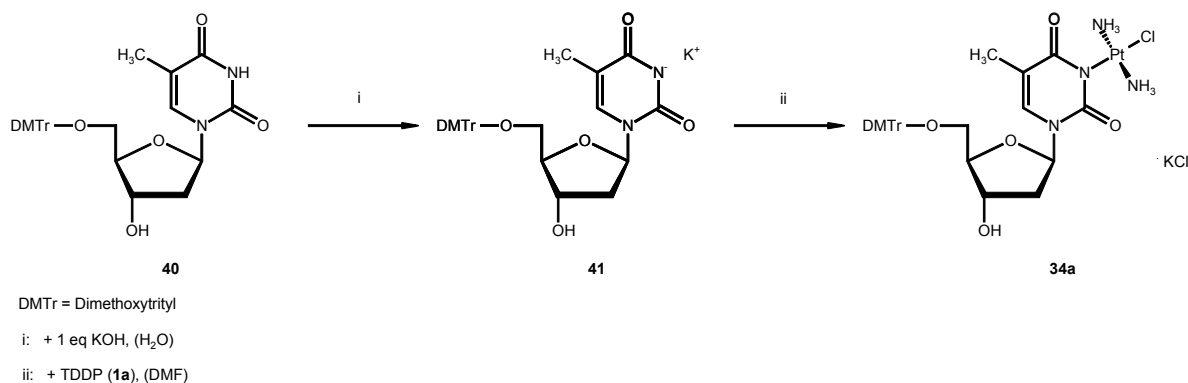


Abb. 20: Direkte Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) in DMF

Die Herstellung des Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylates (**41**) erfolgte analog der Synthesevorschrift von *Lock et al.* [54] für die Synthese von Kalium-1-methylthyminat (**39**) ohne den Syntheseschritt des Umlösens in DMF. Im <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat (**39**) ist eine Hochfeldverschiebung von H-6 im Vergleich zum unplatinierterm Thymidin erkennbar (für H-6 wurde über <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY 7.32 ppm gemessen, H-6 von Na-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat erscheint bei 7.51 ppm, alle Verschiebungen in DMSO-d<sub>6</sub>), dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Bildung von Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat (**41**).

Nach Umsetzung von Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat (**41**) mit *trans*-Platin (**1a**) für etwa 8 Stunden bei 50-60°C und 3 Tage bei Raumtemperatur in DMF und Reinigung über eine Kieselgelsäule (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) wurden aber nur ca. 20 % Produkt erhalten, obwohl ein vorher aufgenommenes DC eine hohe Umsetzung zum gewünschten Produkt zeigte. Die Wiederholung der Synthese im präparativen Maßstab ergab nach chromatographischer Trennung mit derselben Säule ca. 70 % Produktausbeute. Die deutlich höhere Ausbeute bei Anwendung eines größeren Verhältnisses von zu trennender Substanz zu Kieselgel läßt die Schlußfolgerung zu, daß Kieselgel unter teilweise ablaufendem Austausch des Chloroliganden mit dem Platinkomplex reagiert bzw. die Hydrolyse des Chloroliganden unterstützt. Daher erfolgte nach erneuter Synthese die Reinigung an silanisiertem Kieselgel im Laufmittel Chloroform/Methanol = 99.5/0.5 unter Zusatz von 0.2 % Triethylamin. Dabei konnte *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) mit ca. 80 % Ausbeute isoliert werden. Die Struktur des Nucleosides wurde mit <sup>1</sup>H-NMR bestätigt. Eine ausführlichere Charakterisierung des entsprechenden H-Phosphonates, das auf vergleichbare Weise platinierter wurde, ist in Abschnitt 6.2 beschrieben.

Die Phosphitylierung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) erfolgte mit Chlor-2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (**42**) nach der Vorschrift von *Atkinson et al.* [55] unter Verwendung von Triethylamin statt Diisopropylamin als Base.

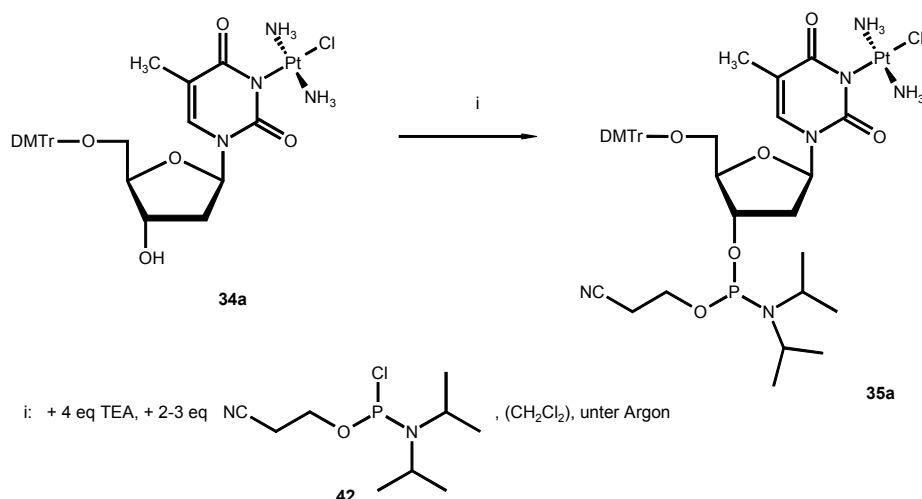


Abb. 21: Phosphitylierung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**)

Das nach 10 Minuten aufgenommene HPTLC der Reaktionslösung zeigt eine nur sehr geringe Menge eines sehr polaren Stoffes, fast keinen Ausgangsstoff, zwei Hauptprodukte (Diastereomere) mit  $R_f$ -Werten von  $R_f = 0.23$  und  $R_f = 0.27$  (in Chloroform/Isopropanol = 95/5 mit 1 % Triethylamin an Kieselgel) sowie die beiden Diastereomere des deplatinierten Nucleosid-3'-phosphoramidites, das als Vergleich auf die HPTLC - Platte mit aufgetragen wurde (Abb. 22). Die Herstellung des O<sup>5'</sup>-DMTr-Thymidin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidites (**26d**) als Vergleich erfolgte nach der bei *Barone et al.* beschriebenen Phosphitylierung mit 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit [56]. Der in der unplatinierten Vergleichssubstanz sichtbare dritte Substanzfleck ist auf eine teilweise Zersetzung der DC - Vergleichssprobe zurückzuführen.



Abb. 22: HPTLC der Phosphitylierung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) (Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/iPrOH = 95/5 + 1 % TEA, an Kieselgel)

Bei den beiden Hauptprodukten handelt es sich nach der Lage auf der HPTLC - Platte zu urteilen um die beiden Diastereomere (chirale Phosphorverbindung) des gewünschten phosphitylierten Chloroplatinkomplexes **35a** (Abb. 21). Durch das verwendete Sprühreagenz (salzsaure Zinn(II) - Lösung) wurde parallel Platin und die DMTr - Gruppe nachgewiesen.

Wie in Abb. 22 erkennbar ist, tritt während der Phosphitylierung bereits Deplatiniierung auf. Da eine Deplatiniierung des Nucleosides Thymidin durch Protonierung der Nucleobase nicht

zu diskutieren ist (das Phosphoramidit hätte sich vorher vollständig zersetzt), ist es sehr wahrscheinlich, daß ein sehr fest bindender Ligand am Platinatom durch Austausch mit dem Chloroliganden das sich in *trans* - Stellung befindende Thymidin gelöst hat. Verantwortlich dafür könnte das als Phosphitylierungsmittel eingesetzte Chlor-2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit **42** sein (Abb. 23). Die hohe Bindungsstärke von Phosphinliganden an Platin(II) - Komplexen ist bekannt [51].

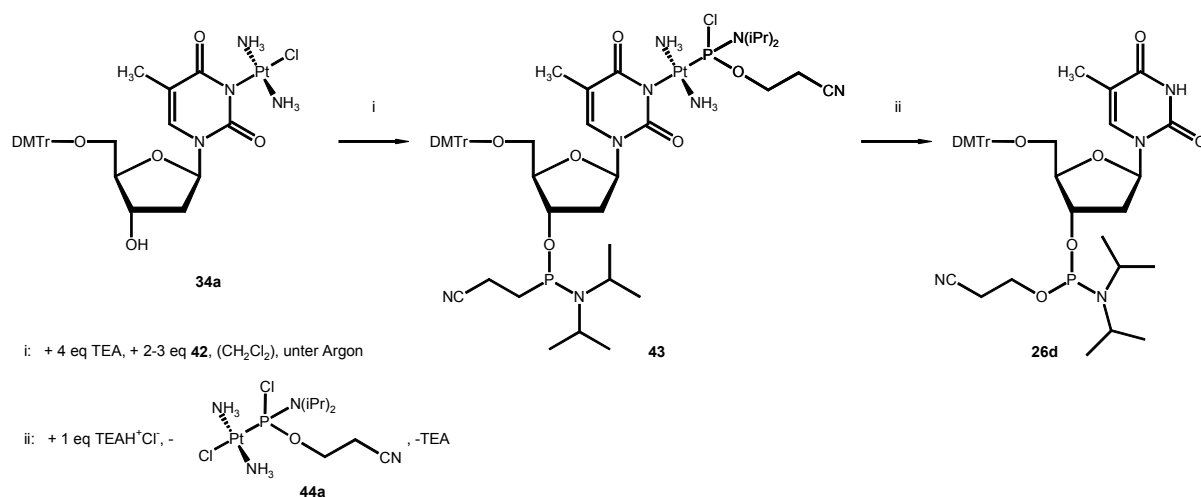


Abb. 23: Deplatinyierung des Thymidinderivates als Nebenreaktion während der Phosphitylierung von  $\text{trans}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^5\text{'-DMTr-Thyd}_\text{H})]$  **34a**

Um Nebenreaktionen, d.h. Austausch des Chloroliganden während der chromatographischen Reinigung an Kieselgel zu vermeiden, wurde nach Abrotieren des Dichlormethans die Reinigung mehrfach an silanisiertem Kieselgel im Laufmittel Chloroform/Methanol = 99.5/0.5 unter Zusatz von 0.2 % Triethylamin versucht. Dies führte stets zu einer unvollständigen bzw. überhaupt nicht erfolgten Trennung. Die Ursache dafür ist wohl einerseits die zu hohe Polarität des Laufmittels durch die notwendige Zugabe von Triethylamin und die dadurch bedingte zu schnelle Eluierung der zu trennenden Amidite und andererseits die notwendige Menge Triethylamin in der Reaktionslösung, die vermutlich eine Laufrfront hoher Polarität in dem unpolaren Laufmittel erzeugt und so das Gemisch ungetrennt durch die Säule schiebt. Nach Trennung mit Hilfe von Dickschichtchromatographie an 2 mm Kieselgel wurde ein protonenentkoppeltes  $^{31}\text{P}$ -NMR - Spektrum aufgenommen. Infolge der Luftfeinwirkung während des Ablösens des Kieselgels von der Platte ist die Hauptmenge der isolierten Substanz bei Aufnahme des NMR - Spektrums bereits zersetzt. In Abb. 24 sind bei 149.1 ppm und 149.5 ppm zwei dicht beieinander liegende Signale erkennbar, die dem platiniierten sowie dem deplatinierten Phosphoramidit zugeordnet werden können.

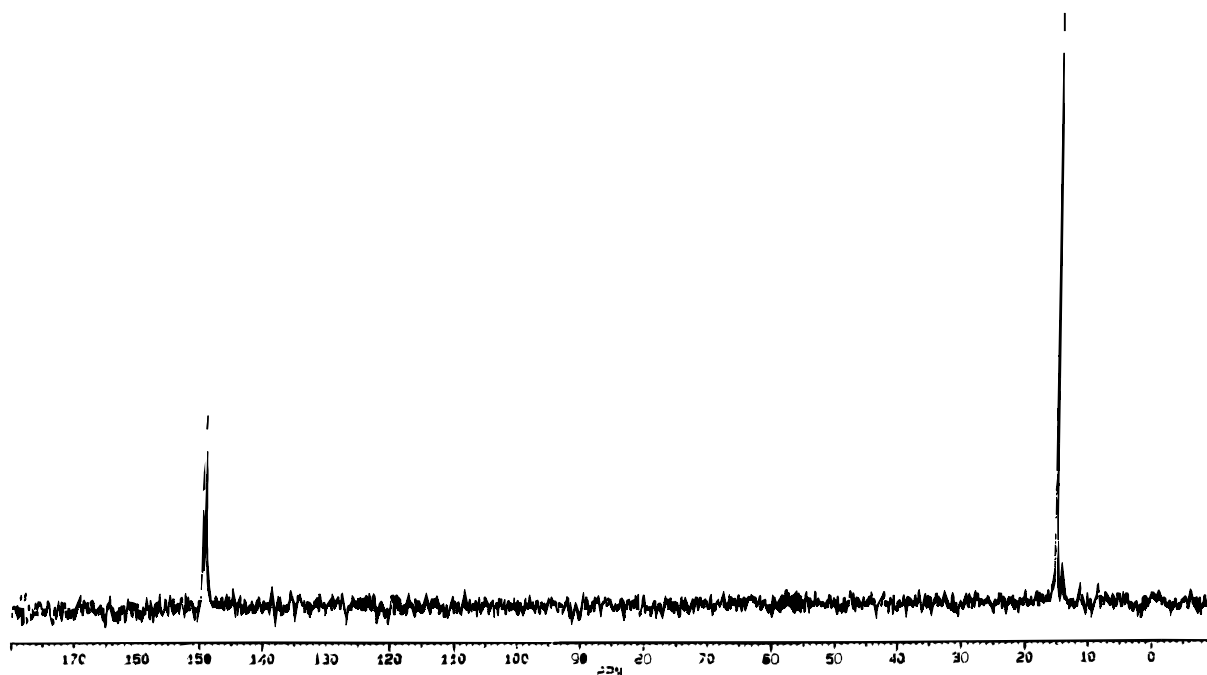


Abb. 24:  $^{31}\text{P}$ -NMR - Spektrum des phosphitylierten *trans*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^{5'}\text{-DMTr-Thyd-H})]$  **35a** (teilweise zersetzt) in  $\text{CDCl}_3$

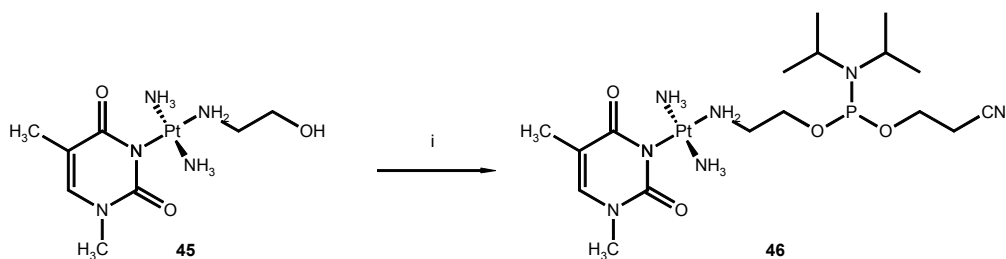
Für die Diastereomere werden nach Erfahrungen der Arbeitsgruppe Prof. D. Cech fast ausnahmslos keine getrennten Signale beobachtet, in einem Fall konnten zwei Signale eines Phosphoramidites mit einer Differenz von 0.07 ppm beobachtet werden. Die hier beobachtete Differenz von 0.4 ppm ist folglich ein deutlicher Hinweis auf die Existenz von zwei verschiedenen Phosphoramiditen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die festgestellte leichte Zersetzbarkeit des synthetisierten platiniierten Phosphoramidites eine Isolierung sehr erschwert und für den Einsatz als platiniierten Synthesebaustein als nicht geeignet erscheinen läßt. Nach Abschluß dieser Arbeiten erschien eine Publikation von *Manchanda et al.*, in welcher die Zersetzung der platiniierten Nucleosidphosphoramidite beschrieben ist [57]. Dies bestätigt das erhaltene Ergebnis. Auch *Manchanda et al.* verwendeten für den Einbau eines platiniierten Nucleosides zum Zweck der Synthese eines platiniierten Oligonucleotides schließlich das H-Phosphonat - Verfahren.



## 5.2 Ankupplung eines phosphitylierten Nucleobase - Platin - Komplexes an die 5'-Position eines Oligonucleotides

An einer anderen Strategie zur Anbindung eines Platinkomplexes an ein Oligonucleotid wurde zu dieser Zeit in der Arbeitsgruppe von Prof. B. Lippert an der Universität Dortmund gearbeitet. Dabei sollte an die 5'-terminale Position eines synthetisierten Oligonucleotides ein N-Aminoalkohol - Platinkomplex angebunden werden, der am Platinatom einen oder zwei selektiv abspaltbare Liganden (1-Methylthymine oder 1-Methyluracil) hat und an der Hydroxyfunktion phosphityliert ist. Die Phosphitylierung eines solchen Komplexes sollte im Rahmen dieser Arbeit realisiert werden.



i: + 4 eq TEA, + 2-3 eq **42**, (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), unter Argon

Abb. 25: Phosphitylierung von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2N-(2\text{-Aminoethanol})(1\text{-MeT-H})]^+$  **45**

Entsprechend dieser Strategie wurde der von Ulrich Berghoff in Dortmund synthetisierte  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2N-(2\text{-Aminoethanol})(1\text{-MeT-H})]^+$  - Komplex (**45**) unter Verwendung von 2-Cyanoethylchloro-N,N-diisopropylamino-phosphoramidit **42** als Phosphitylierungsmittel in einer der von *Atkinson et al.* beschriebenen Synthese [55] ähnlichen Prozedur phosphityliert. Dazu wurde der Ausgangskomplex mit Dichlormethan/Pyridin = 9/1 codestilliert, unter Argon in Dichlormethan suspendiert und mit 4 eq Triethylamin und 1.3 eq Phosphitylierungsmittel umgesetzt, nach einer Stunde weitere 1.3 eq Phosphitylierungsmittel **42** zugegeben und nach 20 Stunden Reaktion bei Raumtemperatur alle ungelösten Bestandteile abgesaugt. Eine Verfolgung der Reaktion mit DC erfolgte aufgrund der geringen Löslichkeit des Komplexes nicht, aus gleichem Grund wurde die Reaktion mit größerem Überschuß an Phosphitylierungsmittel und über 20 Stunden durchgeführt. Das so isolierte Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung am DNA - Syntheseautomaten eingesetzt.

Die Ankopplung des erhaltenen Produktes an das 5'-Ende des zuvor synthetisierte 5-mers der Sequenz (T)<sub>5</sub> erfolgte in einem Kupplungsschritt über 10 Minuten. Nach Entblockung mit 0.1 M NaOH für 20 Stunden bei Raumtemperatur wurden mit Hilfe präparativer HPLC zwei Produkte isoliert (Abb. 26). Da bei der Festphasensynthese des 5-mers (T)<sub>5</sub> dem

Kupplungsprotokoll nach zu urteilen ein Nebenprodukt in größeren Mengen nicht denkbar ist, zeigt dies die Entstehung eines modifizierten Oligonucleotides an.

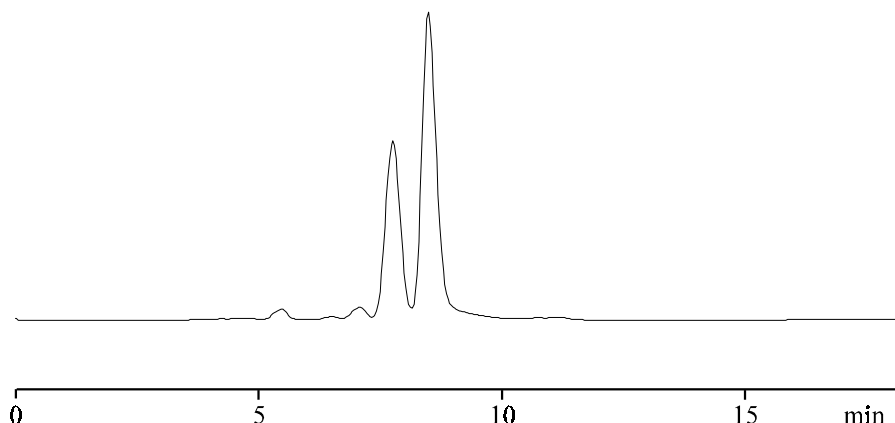


Abb. 26: HPLC der Produkte der Synthese von  $trans\text{-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-}\{(T)_5\text{-P}^5\})\{(1\text{-MeT-H})\}]^+$

Der Vergleich der beiden isolierten Produkte mit dem zum Vergleich synthetisierten unmodifizierten Oligonucleotid gleicher Sequenz zeigt, daß das Hauptprodukt das unmodifizierte Oligonucleotid  $(T)_5$  darstellt (Abb. 27).

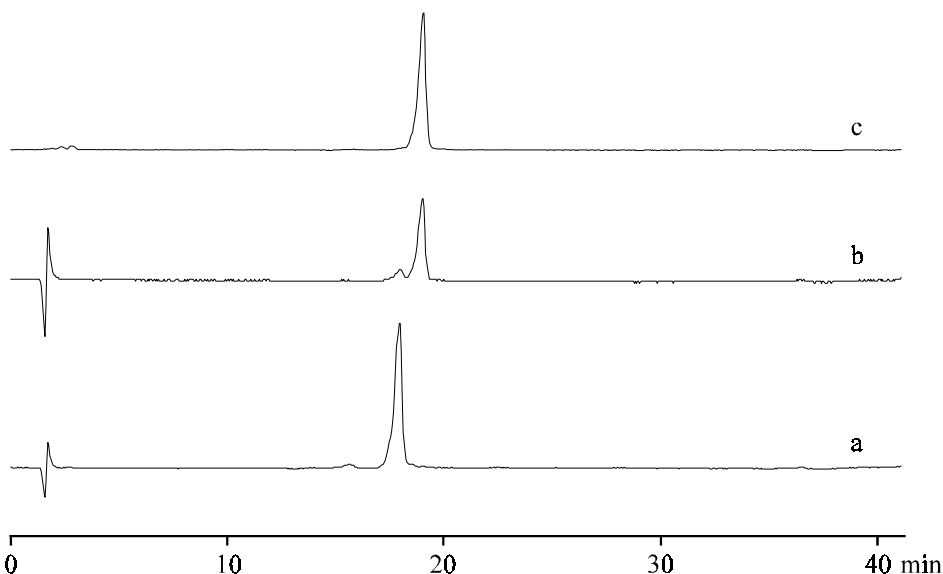


Abb. 27: HPL - Chromatogramme a) des präparativ isolierten  $trans\text{-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-O-}\{(T)_5\text{-P}^5\})\{(1\text{-MeT-H})\}]^+$ , b) des abgetrennten unmodifizierten Produktes und c) des unmodifizierten 5-mers  $(T)_5$

Die Ausbeute an modifiziertem Oligo beträgt nach Integration der Peakflächen im HPLC - Chromatogramm der präparativen Trennung unter Berücksichtigung der abgeschätzten Extinktionskoeffizienten beider Produkte 33 % (Abb. 26).

Im HPL - Chromatogramm des mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase enzymatisch hydrolysierten modifizierten 5-mers sind zwei Substanzpeaks erkennbar, die eine Modifizierung bestätigen (Abb. 28).

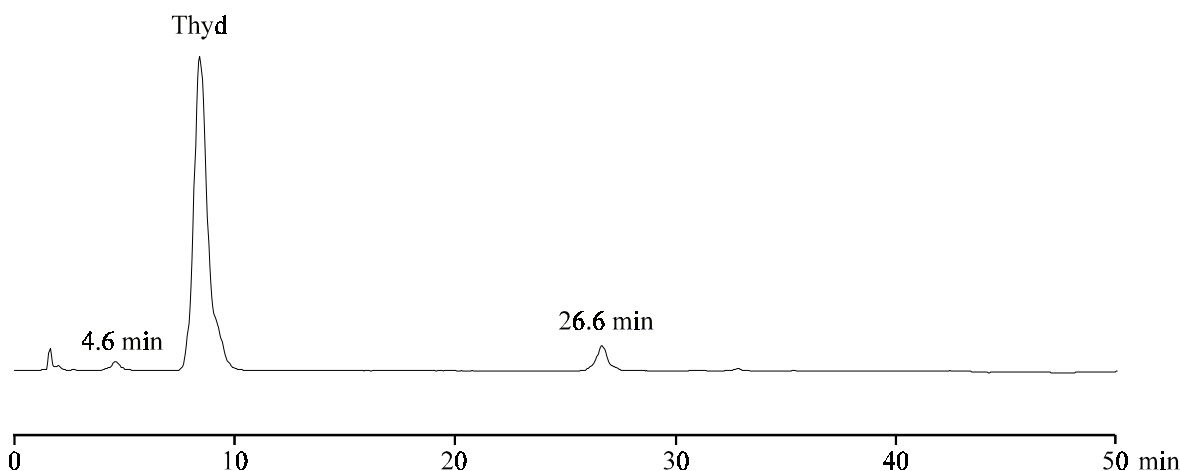


Abb. 28: HPL - Chromatogramm von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-}\{(T)_5\text{-P}^5\})(1\text{-MeT-H})]^+$  nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase

Es ist anzunehmen, daß der Substanzpeak bei 4.6 min  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{N-(2-Aminoethanol)}(1\text{-MeT-H})]^+$  (**45**) entspricht, ein Austausch eines der Liganden ist nicht wahrscheinlich, da alle Liganden am Platin eine hohe Stabilität aufweisen. Völlig ausschließen kann man eine Deplatinierung von 1-Methylthymidin infolge Protonierung durch 1H-Tetrazol während der Kupplung zwar nicht, später wird jedoch gezeigt werden, daß eine Deplatinierung von Thymidin infolge Protonierung durch 1H-Tetrazol während der Kupplung von Phosphoramiditen keine bevorzugte Reaktion darstellt (Abschnitt 7). Etwas überraschend ist das Auftreten eines Substanzpeaks bei 26.6 min. Da Schlangengift - Phosphodiesterase eine 3'-Exonuclease ist, sollte die Hydrolyse des Phosphorsäurediesters an der 5'-Position des Oligonucleotides durch das Platin nicht direkt behindert werden, dennoch ist eine Verlangsamung der enzymatischen Hydrolyse denkbar, da eine räumliche Nähe der negativ geladenen Phosphorsäurediestergruppe und des positiv geladenen Platinkomplexes infolge von Coulomb - Wechselwirkungen anzunehmen ist (Abb. 29).

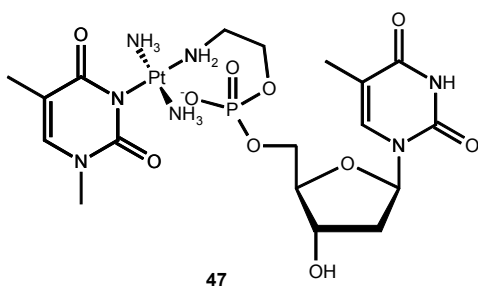


Abb. 29: Vermutetes primäres Hydrolyseprodukt des enzymatischen Abbaus von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Aminoethyl-2-O-}\{(T)_5\text{-P}^5\})(1\text{-MeT-H})]^+$

Dies würde das Auftreten einer Substanz im Bereich des beobachteten Substanzpeaks bei 26.6 min erklären, entsprechend könnte es *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N-Aminoethyl-2-O-{(T)-P<sup>5'</sup>})(1-MeT<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> (**47**) sein (Abb. 29).

Das isolierte platinmodifizierte Oligonucleotid wurde in Dortmund an Herrn Ulrich Berghoff aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Lippert (Universität Dortmund) übergeben, weitere Untersuchungen konnten daher nicht erfolgen.

Ein endgültiger Beweis für die richtige Struktur des synthetisierten Oligonucleotidkonjugates konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Dennoch wurden klare Hinweise darauf erzielt, daß die Synthese und die Ankupplung von platinieren Phosphoramiditen an Oligonucleotide möglich ist, wenn einerseits alle Liganden am Platinatom eine genügend hohe Stabilität haben und andererseits der betreffende Platinkomplex eine ausreichend große Löslichkeit unter Kupplungsbedingungen besitzt.

## 6 Synthese und Platinierung von O<sup>5'</sup>-DMTr-Thymidin-H-phosphonat und dessen Einbau in Oligonucleotide

### 6.1 Festphasensynthese von Oligodesoxynucleotiden nach dem H-Phosphonat - Verfahren

Da das H-Phosphonat - Verfahren vom DNA/RNA - Synthesautomaten der Firma Pharmacia, dem Gene-Assembler, standardmäßig nicht unterstützt wird, war es notwendig, die automatisierte Oligonucleotid-Synthese am Gene-Assembler zu etablieren. Nach dem Protokoll von *Garegg et al.* [58] wurde ein Syntheseprogramm angefertigt (vgl. Abschnitt 10.4). Der Monomerenüberschuß betrug bei allen Standardsynthesen 25 eq, die Menge an Aktivierungsreagenz 100 eq bei Pivaloylchlorid und 150 eq bei Adamantanoylchlorid, die Kupplungszeit 2 Minuten, die Oxidation erfolgte mit 2 % Iod in Pyridin/H<sub>2</sub>O = 98/2 für 10 Minuten. Die Abhängigkeit der Kupplungsausbeute von der Anzahl der Segmente<sup>2</sup> (2, 4 und 8) von Monomerenlösung und Aktivierungsreagenz (alternierend) wurde mit Pivaloylchlorid als Aktivierungsreagenz untersucht. Die Kupplungsausbeuten bei 4 und 8 Segmenten waren etwa gleich. Deshalb fand die Methode mit 4 Segmenten Verwendung, um die Bildung von unerwünschtem Diacylphosphit auf ein Minimum zu begrenzen, das bei Reaktion des Pivaloylchlorides mit dem H-Phosphonat vor der „Zugabe“ der Hydroxyverbindung bevorzugt entsteht (vgl. Abschnitt 3, Abb. 10). Der HPLC-Vergleich von einem so hergestellten 10-mer mit einem Oligonucleotid gleicher Sequenz, das nach dem Amidit - Verfahren synthetisiert wurde, ist in Abb. 30 dargestellt. Der Vergleich des Chromatogramms in Abb. 30b mit dem in Abb. 30a zeigt, daß die Anwendung des H-Phosphonat - Verfahrens ebenso zu einer sehr hohen Produktausbeute führt. Einziger weiterer Peak in relevanter Größe stellt der Substanzpeak bei 15 Minuten (Abb. 30b) dar, hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um das O<sup>5'</sup>-detritylierte Produkt, dies wäre damit kein Nebenprodukt, das während der Festphasensynthese entstanden ist. Der Vergleich der Kupplungsausbeuten bei Aktivierung mit Pivaloylchlorid bzw. Adamantanoylchlorid ergab für Pivaloylchlorid die besseren Kupplungsausbeuten (vgl. Anlage 1 und Anlage 2).

---

<sup>2</sup> Als „Segmente“ werden hier die Abschnitte verschiedener Lösungen bezeichnet, mit denen die Lösungsmittelschleife für die Kupplungsreaktion hintereinander beladen wird. Ist die Zahl der Segmente zu niedrig, erfolgt keine optimale Durchmischung während der Kupplungsreaktion.

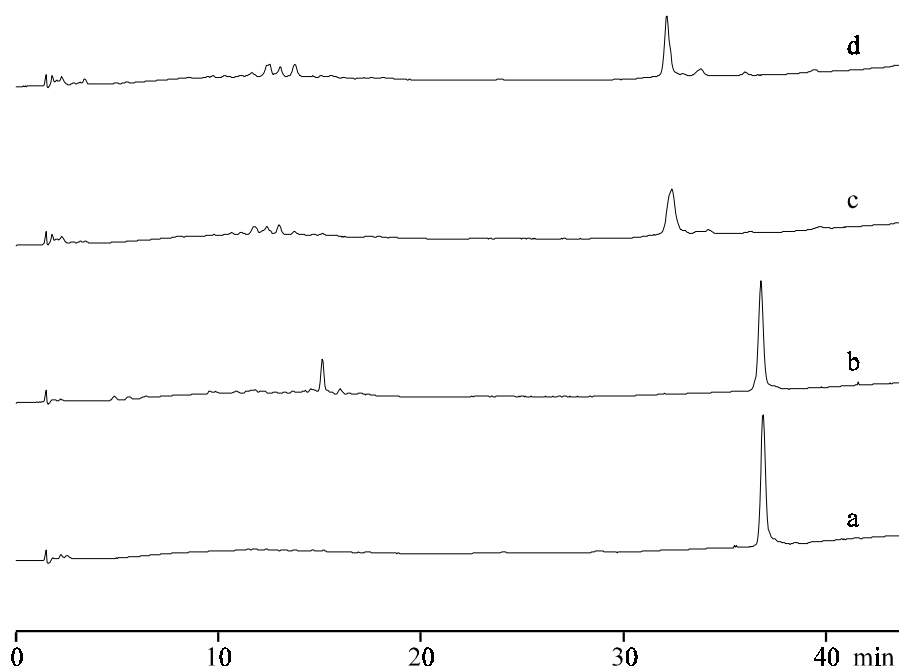


Abb. 30: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthesen von O<sup>5'</sup>-DMTr-d(TTTCCTTTT), hergestellt a) nach dem Amidit - Verfahren und b) nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Pivaloylchlorid als Aktivierungsreagenz; HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthesen von O<sup>5'</sup>-DMTr-d(CCCTTTCCC), hergestellt c) mit Pivaloylchlorid und d) mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsreagenz nach dem H-Phosphonat - Verfahren

Schlußfolgernd kann gesagt werden, daß das H-Phosphonat - Verfahren zur Synthese von Oligodesoxynucleotiden am Gene-Assembler erfolgreich etabliert wurde.

## 6.2 Synthese des Monomerenbausteines „Pt-T“

Aufgrund der bekannten hohen Stabilität von platinerten Thyminderivaten wurde entschieden, für das zu platinierende Nucleosid Thymidin zu verwenden (vgl. Abschnitt 4). Die hohe Stabilität von platinerten Thyminderivaten ist von *Raudaschl-Sieber et al.* beschrieben [30].

Nucleosid-H-phosphonate (**15**) werden gewöhnlich als Triethylammoniumsalze isoliert. Für Platinierungen, die unter basischen pH-Bedingungen durchgeführt werden, ist der Einsatz von Triethylammoniumsalzen nicht zweckmäßig, da die Deprotonierung des Triethylammonium-Kations als Konkurrenzreaktion zur Deprotonierung des Nucleosides ablaufen kann. Dies betrifft die Platinierung von Thymidinderivaten (vgl. Abschnitt 2), daher wurde das Natriumsalz des an 5'-Hydroxygruppe zuvor nach *Jones* [52] mit der Dimethoxytritylgruppe geschützten Nucleosid-H-phosphonates hergestellt (Abb. 31).

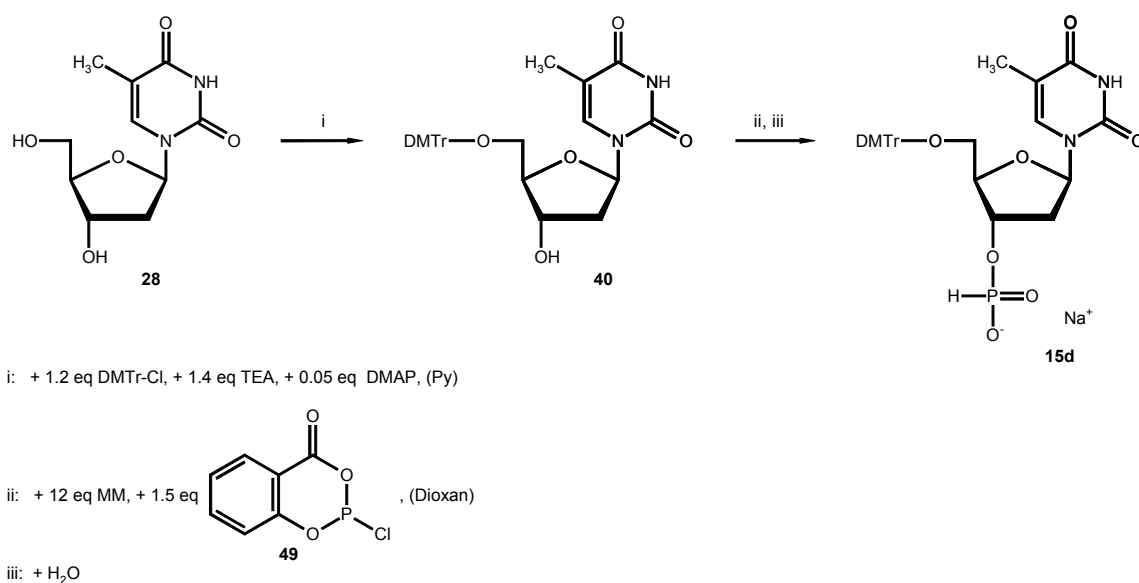


Abb. 31: Synthese von Natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-Thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**)

Die Phosphonylierung geschah nach der bei *Marugg et al.* beschriebenen Prozedur mit Salicyloylchlorophosphit (**49**) [59] unter Verwendung von N-Methylmorpholin als Base, nach mehrmaliger Extraktion der Chloroform-Lösung mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde die organische Phase konzentriert und das Produkt in Aceton gefällt. Nach Absaugen und Trocknen i.V. über KOH wird das Produkt erhalten, das in geringen Mengen Aceton enthält, wie aus dem in Abb. 32a dargestellten <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ersichtlich ist. Das bei 2.13 ppm sichtbare Signal wird Aceton zugeordnet.

Analog der durchgeführten Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>)] (**34a**) (siehe Abschnitt 5.1, Abb. 20) erfolgte die Platinierung über Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**). Während sich das O<sup>5'</sup>-DMTr-Thymidin (**40**) in Wasser nur durch die Salzbildung zum Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat (**41**) vollständig löst, kann und muß das Natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**) vor der Zugabe der Alkalilauge in Wasser gelöst werden. Sinnvoll ist das Auflösen in Wasser bei 0°C, da dies ein schnelles Einfrieren nach Zugabe der Kalilauge mit flüssigem Stickstoff ermöglicht. Erfolgt das Einfrieren der wäßrigen Lösung des gebildeten Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonates (**48**) nicht sofort, setzt die Hydrolyse der H-Phosphonat - Gruppe ein. Bereits nach einigen Minuten Rühren bei Raumtemperatur sind im <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum deutliche Mengen dephosphonyliertes Produkt sichtbar, erkennbar an den Signalen von H-3' und H-4'. Beide Signale sind in diesem Fall nicht einheitlich, neben Signalen bei 5.12 ppm für H-3' und 4.19 ppm für H-4' erscheinen weitere Signale bei 4.52 ppm bzw. 4.03 ppm (alle Signale in DMF-d<sub>7</sub>), die dem dephosphonylierten Produkt zuzuordnen sind (vgl. Tabelle 1). Diese Beobachtung widerspricht der bekannten Hydrolysebeständigkeit von H-Phosphonaten [36], läßt sich aber mit der Bildung von Ionenpaaren erklären. Hierbei wird die negative Ladung der H-Phosphonat - Gruppe durch die positive Ladung des Kations kompensiert, die sonst vorhandene Abstoßung der Hydroxidionen infolge Coulomb - Wechselwirkungen entfällt, und eine basisch katalysierte Hydrolyse kann stattfinden. Bestätigt wird diese Beobachtung durch den von *Nylén* beschriebenen stark positiven Salzeffekt für die Hydrolyse von Phosphonsäuremonoalkylester (H-Phosphonate), in einer elektrolytarmen Lösung ist die Geschwindigkeitskonstante der basischen Hydrolyse deutlich kleiner als in einer Lösung mit hoher Elektrolytkonzentration [42]. Wird also die wäßrige Lösung des gebildeten Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonates (**48**) sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren, wird nach Lyophilisieren der eingefrorenen Lösung Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**) (nahezu) quantitativ erhalten.

Das <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**) ist in Abb. 32b dargestellt. Der Vergleich mit dem <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von Natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**) (Abb. 32a) zeigt die Abwesenheit des aciden N<sup>3</sup>-H - Protons an. Weiterhin wird deutlich, daß das Signal von H-8 zu hohem Feld verschoben ist, es wird von den aromatischen Protonen der DMTr - Gruppe überlagert. Dies sind deutliche Hinweise auf die Bildung des Thymidylates. Die vollständige Zuordnung der Signale der <sup>1</sup>H-NMR - Spektren von Natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**) und Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Platinierungsreaktion selbst erfolgte in Analogie zu der Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>)] (**34a**) (siehe Abschnitt 5.1).



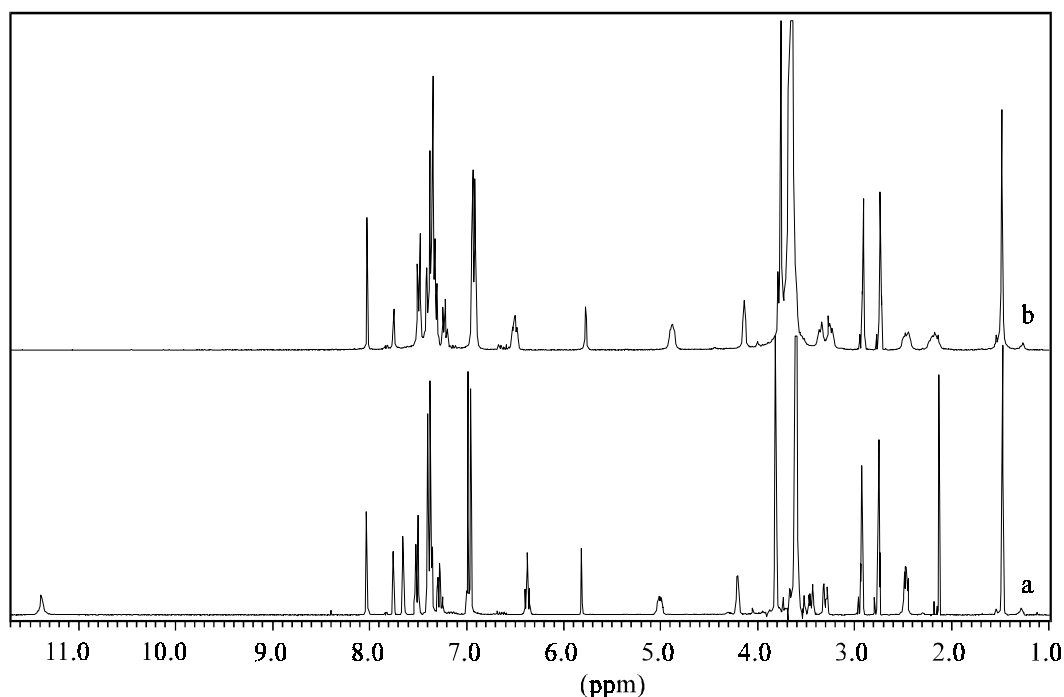


Abb. 32: <sup>1</sup>H-NMR - Spektren a) von Natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymin-3'-H-phosphonat (**15d**) und b) von Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**) in DMF-d<sub>7</sub>

Dabei wurde das zuvor erhaltene Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**) mit 1 eq *trans*-Platin (**1a**) in DMF bei 50-60°C für ca. 24 Stunden umgesetzt. Diese Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3) verfolgt. War nach einem Tag noch unplatiniertes Nucleosid erkennbar, erfolgte die weitere Zugabe einer geringen Menge *trans*-Platin (**1a**) (etwa 0.1 eq) sowie weitere Reaktion bei 50 - 60°C für wenige Stunden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde noch ca. 2 Tage rühren gelassen, dann das DMF vollständig im Vakuum abrotiert, mit Methanol versetzt und für einen weiteren Tag rühren gelassen. Nach dem Absaugen der ungelösten Bestandteile wurde das Filtrat einrotiert. Das so erhaltene Rohprodukt enthält noch DMF, dies geht aus <sup>1</sup>H-NMR - Spektren hervor, die in DMSO gemessen wurden. Durch Kochen in Aceton am Rückfluß für ca. 3 Stunden wird die DMF - freie Platinspezies erhalten (86 % Ausbeute).

### Analytische Charakterisierung

Das so isolierte platinierte Produkt wird als KCl - Addukt erhalten, dies geht aus der Elementaranalyse hervor. In Abb. 33 ist das <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] (**29a**) dargestellt, auch hier zeigt sich das Signal bei 2.12 ppm, das Aceton zuzuordnen ist (vgl. Abb. 32a). Elementaranalysen deuten darauf hin, daß die Substanz primär neben KCl und H<sub>2</sub>O auch 1 Molekül Aceton enthält, letzteres jedoch an der Luft gegen zwei Moleküle Wasser ausgetauscht wird (vgl. Abschnitt 10.3).

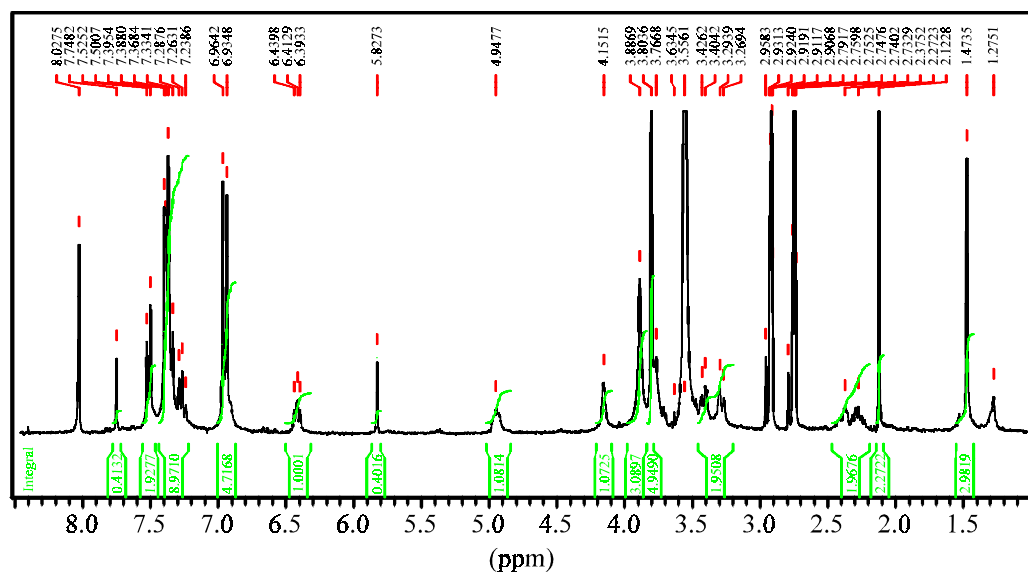


Abb. 33: <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd-H-3'-H-phosphonato)] (**29a**)

Wie bereits im <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum von Kalium-natrium-O<sup>5</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**) wird auch hier die erwartete Hochfeldverschiebung von H-6 gegenüber der unplatinerten Verbindung Natrium-O<sup>5</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**) beobachtet.

Tabelle 1: Chemische Verschiebungen  $\delta$  (ppm) der <sup>1</sup>H - Atome von Natrium-O<sup>5</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**), Kalium-natrium-O<sup>5</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat (**48**), *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd-H-3'-H-phosphonato)] (**29a**) und *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd-H-3'-H-phosphonato)] (**29c**) in DMF-d<sub>7</sub>

<b>15d</b>	<b>48</b>	<b>29a</b>	<b>29c</b>	Zuordnung
11.39 (s)				N <sup>3</sup> H
7.65 (s)	7.35 <sup>3</sup>	7.37 <sup>3</sup>	7.40 <sup>3</sup>	H-6
7.52-6.95 (m)	7.51-6.92 (m)	7.53-6.93 (m)	7.52-6.94 (m)	Trityl
6.78 (d)	6.77 (d)	6.79 (d)	6.77 (d)	3'-O-P-H
6.37 (d,d)	6.51 (d,d)	6.41 (d,d)	6.42 (d,d)	H-1'
5.02 (m)	4.89 (m)	4.95 (m)	4.96 (m)	H-3'
4.20 (m)	4.14 (m)	4.15 (m)	4.16 (m)	H-4'
		3.89 (s)	3.87 (s)	Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
3.81 (s)	3.77 (s)	3.80 (s)	3.80 (s)	CH <sub>3</sub> O
3.47-3.28 (m)	3.35 (m), 3.29 (m)	3.41 (m), 3.28 (m)	3.41 (m), 3.30 (m)	H-5', H-5''
2.47 (m)	2.46 (m), 2.19 (m)	2.38 (m), 2.27 (m)	2.4 (m), 2.3 (m)	H-2', H-2''
1.47 (s)	1.50 (s)	1.47 (s)	1.49 (s)	5-CH <sub>3</sub>

<sup>3</sup> ermittelt durch <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY

Alle Signale liegen in den erwarteten Bereichen, wie aus Tabelle 1 hervorgeht. Das Produkt wurde neben <sup>1</sup>H-NMR - , <sup>13</sup>C-NMR - und <sup>31</sup>P-NMR - auch <sup>195</sup>Pt-NMR - spektroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich ein Signal bei -2265 ppm (relativ zu [PtCl<sub>6</sub>]<sup>2-</sup>, in DMF-d<sub>7</sub>), was die Einheitlichkeit des Produktes in Bezug auf die Platin - Koordinationssphäre beweist. Diese <sup>195</sup>Pt-NMR - Verschiebung liegt im für eine PtN<sub>3</sub>Cl - Koordinationssphäre erwarteten Bereich (nach Appleton *et al.* [60]) und unterscheidet sich klar von den Verschiebungen für freies *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (**1a**) bzw. dessen DMF - Solvolyseprodukte [61]. Der Versuch, dieses Produkt säulenchromatographisch an silanisiertem Kieselgel zu reinigen, führte aufgrund der hohen Polarität der Substanz und der zum Lösen der Verbindung notwendigen Polarität des Laufmittels nicht zum Erfolg, die dünnschichtchromatographische Kontrolle auf einen vollständigen Umsatz des eingesetzten Nucleosid - Salzes ist daher von entscheidender Bedeutung für die Einheitlichkeit des erhaltenen Produktes.

Da *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] (**29a**) direkt nach der Isolierung DMF - haltig vorliegt, wurde die Substanz durch FT-IR - Messung im FIR - Bereich untersucht. Sowohl das DMF - Addukt als auch der DMF - freie Komplex zeigen eine Bande bei  $\nu = 330\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 34, Bild A und B), die der Pt-Cl - Valenzschwingung entspricht. Dies wird aus dem Vergleich der FIR - Spektren mit dem von *trans*-Platin (**1a**) deutlich (Abb. 34, Bild C, a).

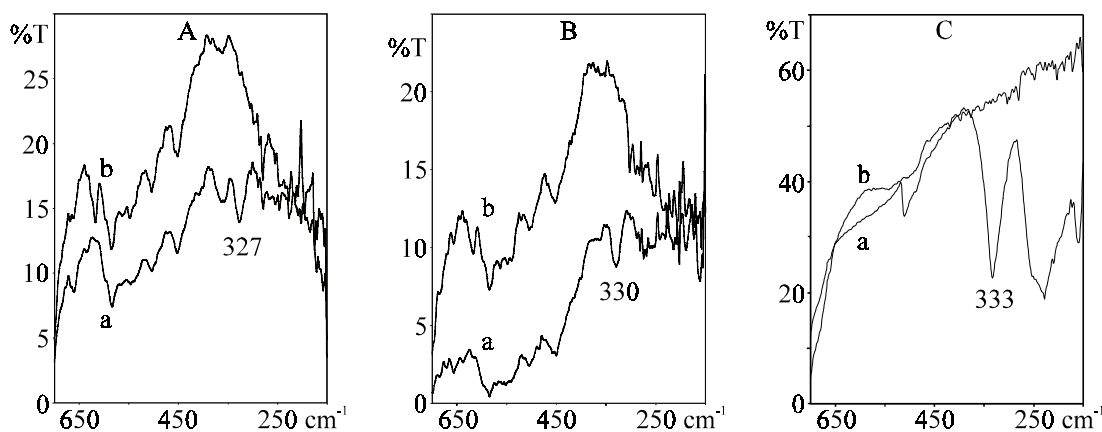
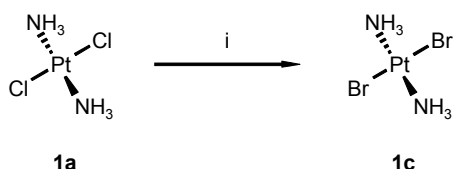


Abb. 34: FIR - Spektrum des DMF - haltigen (Bild A) sowie des DMF - freien (Bild B) *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] (**29a**) a) vor und b) nach Behandlung mit konz. NH<sub>3</sub> - Lösung, FIR - Spektrum von *trans*-Platin (**1a**) (Bild C, a) sowie der PE - Matrix ohne Substanz (Bild C, b)

Nach Behandlung mit konz. NH<sub>3</sub> - Lösung ist die Bande bei  $\nu = 330\text{ cm}^{-1}$  bei dem DMF - haltigen wie bei dem DMF - freien *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] (**29a**) nicht mehr zu beobachten (Abb. 34, Bild A und B, b). Dies zeigt, daß auch die DMF - haltige Verbindung ein Chloroplatinkomplex ist und nicht als DMF - koordinierter Chlorid - Komplex vorliegt. Damit wird die Einordnung der gemessenen <sup>195</sup>Pt-NMR - Verschiebung in eine PtN<sub>3</sub>Cl - Koordinationssphäre bezüglich des Chloroliganden bestätigt.

### Synthese der bromoanalogen Platinverbindung

Zur Verringerung von Nebenreaktionen während der Synthese der platinieren Oligonucleotide, die durch den relativ reaktiven Chloroliganden am Platin verursacht werden (siehe Abschnitt 6.3), wurde dieser durch den weniger reaktiven Bromoliganden ersetzt. Diese Gruppe sollte noch reaktiv genug sein, um eine zweite Koordination zu einem Nucleosid zu ermöglichen. Die Synthese dieser Platinverbindung erfolgte auf analogem Weg mit *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (**1c**). Dafür wurde *trans*-Platin (**1a**) in 1 M wäßriger KBr suspendiert und 24 Stunden bei 90°C reagieren lassen, ein mehr als doppelter Überschuß an Bromidionen wurde dabei eingehalten (Abb. 35).

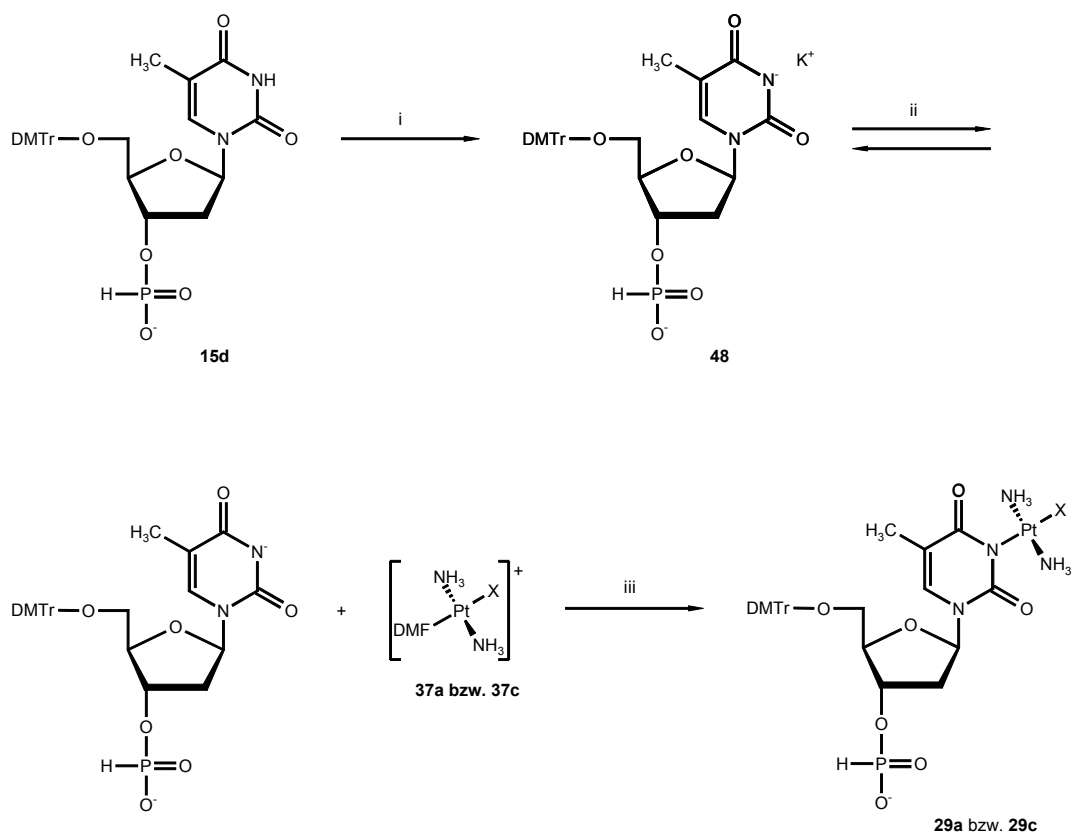


i: 4.7 eq KBr, (H<sub>2</sub>O), 24h bei 90°C, 5 d bei RT

Abb. 35: Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (**1c**)

Nach mehreren Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurde *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (**1c**) mit 93 % Ausbeute isoliert. Das so erhaltene *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (**1c**) wurde analog dem *trans*-Platin (**1a**) mit KNa-O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonat (**48**) umgesetzt (Abb. 36), dabei konnte *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] (**29c**) erhalten werden, das einen alternativen Synthesebaustein für den Einbau von platinierter Thymidin darstellt. Eine vollständige analytische Charakterisierung erfolgte von diesem Bromoisomer **29c** nicht, es wurde analog dem Chloroisomer **29a** für die weitere Synthese eingesetzt (vgl. Abschnitte 6.3 und 7.4). Die Signale des <sup>1</sup>H-NMR - Spektrums von **29c** sind in Tabelle 1 zugeordnet, die dabei erhaltenen Werte sind nahezu identisch mit denen des Chloroisomers **29a**.

Die Tatsache, daß diese Reaktion auch mit *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (**1c**) durchführbar ist, deutet darauf hin, daß der einfache Ligandenaustausch des Halogenidliganden infolge Solvolyse (in DMF) nicht die alleinige Erklärung für die ablaufende direkte Reaktion der beiden Edukte ist. Es wird vermutet, daß die Bildung von Ionenpaaren der Kalium - bzw. Natriumionen mit den Chlorid - bzw. Bromidionen eine entscheidende Rolle bei der Bildung der DMF - koordinierten Platinspezies (**37a** bzw. **37c**) in ausreichend hoher Konzentration spielt (Abb. 36). Durch Coulomb - Wechselwirkungen von negativ geladenen Thymidylationen (**48**) mit der gebildeten positiv geladenen DMF - koordinierten Platinspezies (**37a** bzw. **37c**) ist dann eine schnelle Folgereaktion erklärbar (Abb. 36).



DMTr = Dimethoxytrityl

X = Cl, Br

i: + 1 eq KOH, (H<sub>2</sub>O)

ii: + *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>X<sub>2</sub>] (**1a** bzw. **1c**), - KX, (DMF)

iii: - DMF, (DMF)

Abb. 36: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Umsetzung von Thymidylat mit Chloro - bzw. Bromoplatin(II) - Komplexen in DMF

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der „Pt-T“ - Synthesebaustein mit zwei verschiedenen reaktiven Gruppe am Platinatom synthetisiert worden ist, die beide in der Lage sind, eine Koordination des Platins mit einem zweiten Nucleosid zu ermöglichen. Nachfolgend war nun zu zeigen, daß die synthetisierten Verbindungen geeignet sind, bei Festphasensynthesen von Oligonucleotiden eingesetzt zu werden.

### 6.3 Synthese von platinieren Oligonucleotiden nach dem Standard - H-Phosphonat - Verfahren unter Verwendung des Synthesebausteines „Pt-T“

Nachdem nun ein ausreichend stabiles platinierter Monomer zur Verfügung stand, erfolgten die Synthesen von einem platinieren 4-mer und einem platinieren 12-mer unter Verwendung des Chloroisomers **29a**. Die durchgeführten Oligonucleotidsynthesen wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese durchgeführt (siehe Abschnitt 6.1). Alternativ fand neben der Entblockung der synthetisierten platinieren Oligonucleotide mit konz. Ammoniaklösung auch die Behandlung mit 0.1 - 0.2 M Natronlauge Anwendung, für die Oligonucleotidsynthesen wurden hierbei anstelle der sonst verwendeten kommerziell erworbenen H-Phosphonate für den Einbau von A und C, die benzoyl - geschützt sind, die entsprechenden isobutyryl - geschützten H-Phosphonate synthetisiert und verwendet. Alle so durchgeführten Synthesen führten zur Entstehung der *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(T<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> - Platinspezies, wie noch gezeigt werden wird.

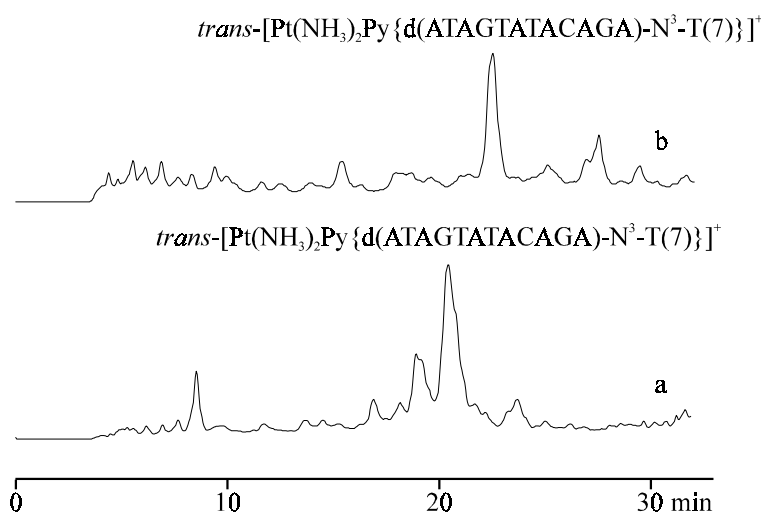


Abb. 37: HPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthesen von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit dem Chloroisomer des platinieren Synthesebausteins nach Entblockung a) mit konz. NH<sub>3</sub> für 16h bei 30°C und b) mit 0.18 M NaOH für 12h bei 40°C und 18h bei RT

Alle in Abb. 37 und Abb. 38 dargestellten Trennungen wurden in dem Laufmittelsystem 0.1 M Ammoniumacetat/Methanol an einer RP - Phase durchgeführt, unterschiedliche Trennbedingungen (Gradient, Temperatur) führen jedoch zu deutlich verschiedenen Retentionszeiten der gleichen Produktpeaks. In allen Chromatogrammen in den Abb. 37 und Abb. 38 entsprechen die isolierten Produkte den Hauptprodukten. Das bei Nichteinbau des platinieren Synthesebausteins resultierende 11-mer bei der Synthese des 12-mers sowie des resultierenden 3-mers bei der Synthese des 4-mers wurde in der Regel nur sehr wenig

beobachtet, wird jedoch eine größere Menge trägergebundenes Startnucleosid bei gleichem Synthesemaßstab verwendet, zeigt sich im Gegensatz zu den unplatinierten H-Phosphonaten ein schlechterer Einbau des platinierten Monomers (Abb. 38c).

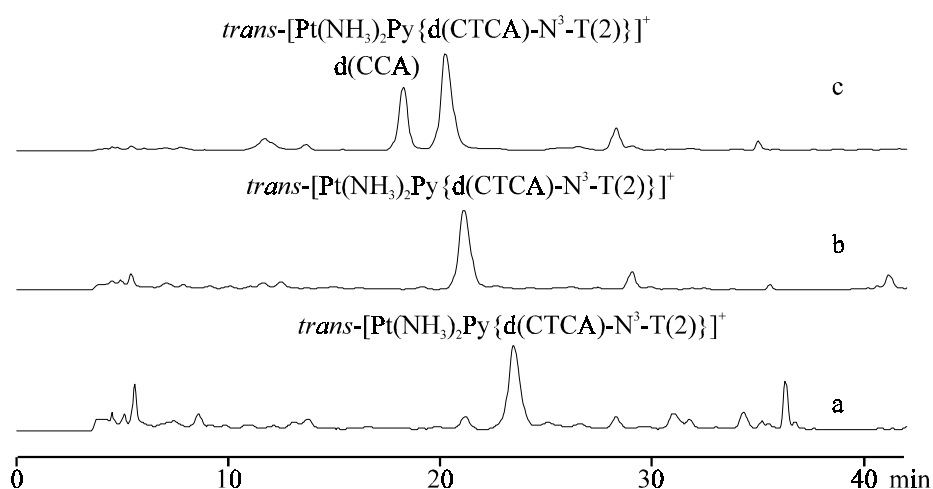


Abb. 38: HPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthesen von d(CXCA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese a) mit dem Chloroisomer des platinierten Synthesebausteins nach Entblockung mit 0.18 M NaOH für 15h bei 50°C, b) mit dem Bromoisomer des platinierten Synthesebausteins nach Entblockung mit 0.18 M NaOH für 12h bei 40°C und 18h bei RT und c) mit dem Bromoisomer des platinierten Synthesebausteins nach Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub> für 14h bei 40°C

Dies zeigt sich bereits im Syntheseprotokoll dieser Synthese (Anlage 5), wie der Vergleich mit denen in Anlage 3 und Anlage 4 dargestellten zeigt. Der direkte Vergleich der in den Syntheseprotokollen angegebenen Werte für die Detritylierung (Anlage 4 und Anlage 5, „Acc Area“ von Base X) zeigt keinen relevanten Unterschied, daher könnte man für die Synthese von d(CXCA) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des platinierten Synthesebausteins bei Einsatz von 0.2 µmol Startnucleosid und Entblockung mit konz. Ammoniaklösung eine vergleichbare Ausbeute erwarten, wie bei Einsatz von 0.3 µmol Startnucleosid erhalten wurden, also 3.2 OD. Dies wäre dann eine Ausbeute von 41 % an isoliertem platinierten 4-mer (siehe Tabelle 2).

Die Verwendung des Bromoisomers des platinierten Synthesebausteins (**29c**) ergab für beide verwendeten Methoden der Entblockung deutlich weniger Nebenprodukte (vgl. Abb. 38a und Abb. 38b) und höhere Ausbeuten an isoliertem Produkt (Tabelle 2). Da selbst bei Verwendung des Bromoisomers des platinierten Synthesebausteins die  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py(T-H)]^+$  - Platinspezies entsteht, erfolgten keine Oligonucleotidsynthesen längerer Sequenz mit dem Bromoisomeren, obwohl eine deutliche Steigerung der Ausbeute gegenüber den Synthesen unter Verwendung des Chloroisomeren zu erwarten wären (vgl. Tabelle 2). Die Ausbeuten an isoliertem platinierten Oligonucleotid waren bei Verwendung von konz. Ammoniaklösung zum Entblocken stets höher als bei der Verwendung von Natronlauge (Tabelle 2).

### Charakterisierung der isolierten platinieren Oligonucleotide

Sowohl die durch Ionenspray-MS bestimmte als auch die durch MALDI-MS bestimmten Molmassen stimmen mit denen für das Vorliegen einer *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(T<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> - Platinspezies berechneten Werte überein (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Isolierte Produktmengen, Produktausbeuten und bestimmte Molmassen der isolierten Hauptprodukte der Synthesen von d(CXCA) und d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) unter den Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese im 0.2 µmol - Synthesemaßstab bei Verwendung des Chloro- bzw. des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ (**29**)

Sequenz	d(CXCA) (X = Pt-T)				d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T)	
Entblockung	konz. NH <sub>3</sub>	OH <sup>-</sup>	konz. NH <sub>3</sub>	OH <sup>-</sup>	konz. NH <sub>3</sub>	OH <sup>-</sup>
isoliertes Hauptprodukt	<i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(CTCA)-N <sup>3</sup> -T(2)}] <sup>+</sup>				<i>trans</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Py{d(ATAGTATACAGA)-N <sup>3</sup> -T(7)}] <sup>+</sup>	
verwendetes Platin - Isomer	Chloroisomer ( <b>29a</b> )		Bromoisomer ( <b>29c</b> )		Chloroisomer ( <b>29a</b> )	
isolierte Produktmenge	0.4 OD <sup>4</sup>	1.0 OD	3.2 OD <sup>5</sup>	1.6 OD	3.5 OD	1.3 OD
Ausbeute	-	13 %	27 % <sup>6</sup>	20 %	12 %	4 %
theoretische Molmasse	m/z = 1441.0				m/z = 3984.7	
gefundene Molmasse	- <sup>7</sup>	m/z <sup>8</sup> = 1439.8	m/z = 1440.9	m/z = 1441.8	m/z = 3985.0	m/z = 3986.7

<sup>4</sup> isolierte Substanzmenge entspricht nicht der unter den angewandten Bedingungen maximal möglichen, eine Ausbeute wurde daher nicht angegeben

<sup>5</sup> Menge an Startnucleosid betrug 0.3 µmol; von dem als Nebenprodukt isolierten d(CCA) wurden 1.0 OD erhalten (siehe Abb. 38c), dies entspricht einer Ausbeute von 11 %

<sup>6</sup> dieser Wert bezieht sich auf die Menge an eingesetztem Startnucleosid von 0.3 µmol, bezogen auf den durchgeführten Synthesemaßstab von 0.2 µmol ergibt sich eine Ausbeute von 41 % an isoliertem Produkt

<sup>7</sup> Molmasse wurde nicht bestimmt, Charakterisierung erfolgte durch enzymatische Hydrolyse und Deplatinierung

<sup>8</sup> diese durch Ionenspray-MS ermittelte Molmasse (Mittelwert aus drei Messungen [m/z]: 1439.4, 1439.6, 1440.4) ist der Monoisotopenpeak, der theoretische Monoisotopenpeak ist m/z = 1440, entsprechend wurde vor dem angegebenen Maximum stets eine Schulter beobachtet, die dem <sup>194</sup>Pt - Isotop zuzuordnen ist



Die durch Ionenspray-MS ermittelte Molmasse des platinieren 4-mers stellt den Monoisotopenpeak dar [62], entsprechend wurde vor dem angegebenen Maximum bei allen Messungen eine Schulter beobachtet, die dem <sup>194</sup>Pt - Isotop zuzuordnen ist. Zur weiteren Charakterisierung der isolierten platinieren Oligonucleotide erfolgten HPL - chromatographische Untersuchungen der enzymatisch hydrolysierten Proben. Zur Quantifizierung der Anzahl der vorhandenen Nucleoside wurden jeweils 0.1 OD des erhaltenen platinieren 12-mers sowie des unmodifizierten 12-mers gleicher Sequenz mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase verdaut (Abb. 39).

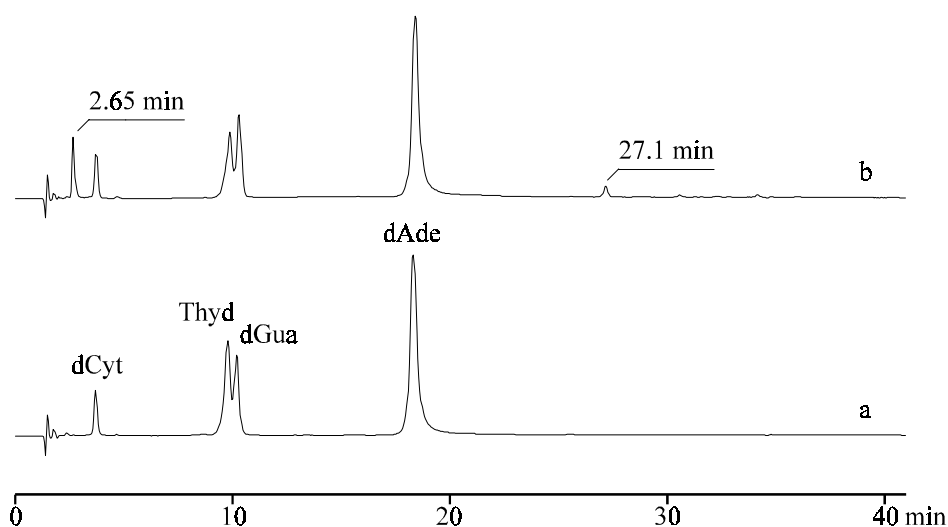


Abb. 39: HPL-Chromatogramme von a) d(ATAGTATACAGA) und b) *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> nach enzymatischer Hydrolyse

Der Vergleich der aus den HPL-Chromatogrammen durch Integration der Peaks erhaltenen Peakflächen bestätigt die erwartete Bruttozusammensetzung des platinieren Oligonucleotides (Tabelle 3).

Tabelle 3: Quantifizierung der Bruttozusammensetzung von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> durch Vergleich der aus dem HPL-Chromatogramm (Abb. 39b) durch Integration der Peaks erhaltenen Peakflächen mit denen von d(ATAGTATACAGA) (Abb. 39a)

Nucleosid	berechnet	theoretisch
dAde	6.0	6
dCyt	1.1	1
dGua	2.1	2
Thyd	2.2	2

Indiz für den erfolgreichen Einbau des platinieren Thymidins sind die Peaks bei 27.1 und 2.65 min (Abb. 39b). Die platinmodifizierte Substanz erscheint allerdings zunächst bei einem Peak bei 27.1 min, der mit der Zeit zugunsten des bei 2.6 min erscheinenden Peaks abgebaut wird (vgl. Abb. 40d). Es war zu vermuten, daß es sich bei ersterem Peak um ein platinisiertes Dinucleotid mit dem eingebauten platinieren Thymidin handelt, d.h. offensichtlich führt die Modifikation zu einer Verlangsamung der enzymatischen Hydrolyse (vgl. auch Abb. 28). Derartige Produkte enzymatischer Hydrolyse für platinmodifizierte Oligonucleotide sind aus der Literatur bekannt [63]. Da es sich bei Schlangengift - Phosphodiesterase um eine 3'-Exonuclease handelt, war zu erwarten, daß die Hydrolyse des Phosphorsäurediesters an der 5'-Position des platinieren Nucleosides am stärksten durch das anwesende Platin behindert wird. Der Vergleich einer anderen enzymatisch hydrolysierten Probe von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> (Abb. 40d) mit dem als Vergleich hergestellten von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(AT)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup> (Abb. 40e, Synthese siehe Abschnitt 7) zeigt, daß der beobachtete Substanzpeak in dem erwarteten Bereich liegt, ein exakter Vergleich der Retentionszeiten ist hier nicht sinnvoll, da die in Abb. 40d und Abb. 40e dargestellten Chromatogramme nicht am selben Tag, d.h. nicht unter völlig identischen HPLC - Bedingungen aufgenommen worden sind.

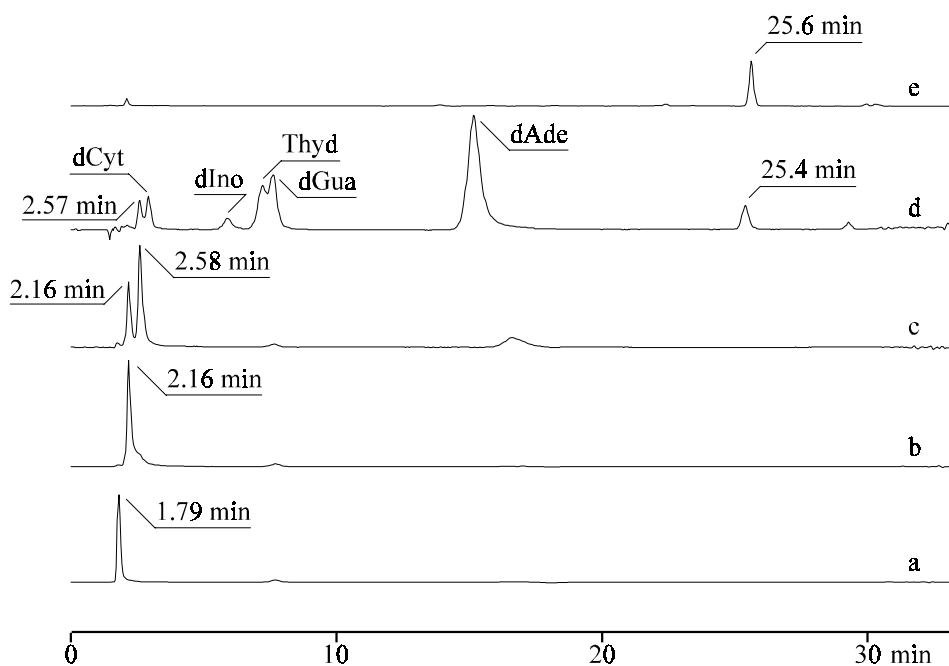


Abb. 40: HPL-Chromatogramme von a) [Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(Thyd<sub>-H</sub>)]<sup>+</sup>, b) *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>-H</sub>)], c) eines Gemisches von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>-H</sub>)] und *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>-H</sub>)]<sup>+</sup>, d) unter Verwendung des Chloroisomers des platinieren Synthesebausteines „Pt-T“ synthetisiertes und mit konz. NH<sub>3</sub> entblocktes d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) nach enzymatischer Hydrolyse und e) *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(AT)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup>

Weiterhin wird deutlich, daß es sich bei dem Endprodukt der enzymatischen Hydrolyse (Abb. 40d, 2.57 min) um *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>-H</sub>)]<sup>+</sup> handelt. Dies resultiert aus dem Vergleich dieser Retentionszeit mit der von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>-H</sub>)]<sup>+</sup> in dem in Abb. 40c

dargestellten HPL-Chromatogramm eines Gemisches mit *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)], das durch Reaktion von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] mit Pyridin für 30 min bei 50°C erhalten wurde. Der HPLC - Vergleich mit dem durch Reaktion von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] mit konz. Ammoniaklösung für 30 min bei 90°C erhalten [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> (Abb. 40a) bestätigt, daß die [Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(T<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> - Platinspezies auch bei Entblockung mit konz. Ammoniaklösung nicht entsteht. Vergleichbare Untersuchungen wurden auch mit dem platinieren 4-mer durchgeführt. Das auch hier als Vergleich abgebildete platiniierte 2-mer (anderer Sequenz) *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CT)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup> (Abb. 41e, Synthese siehe Abschnitt 7) ist im Gegensatz zu dem in Abb. 40e dargestellten unter völlig identischen Bedingungen, d.h. am selben Tag, aufgenommen worden. Es zeigt sich eine völlig exakte Übereinstimmung der Retentionszeit mit der des bei enzymatischer Hydrolyse primär gebildeten Produktes (Abb. 41d). Auch hier ist das Endprodukt *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup>, wie der HPLC - Vergleich (Abb. 41c) deutlich macht. Bemerkenswert ist, daß die Reihenfolge von *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> und *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] (Abb. 41c und Abb. 41a) in den HPL-Chromatogrammen hier anders ist als bei den in Abb. 40b und Abb. 40c dargestellten. Dies ist erklärbar durch die von *Eastman* beschriebene große Abhängigkeit der Retentionszeiten von vor allem kationischen Platinkomplexen von den HPLC - Bedingungen [64].

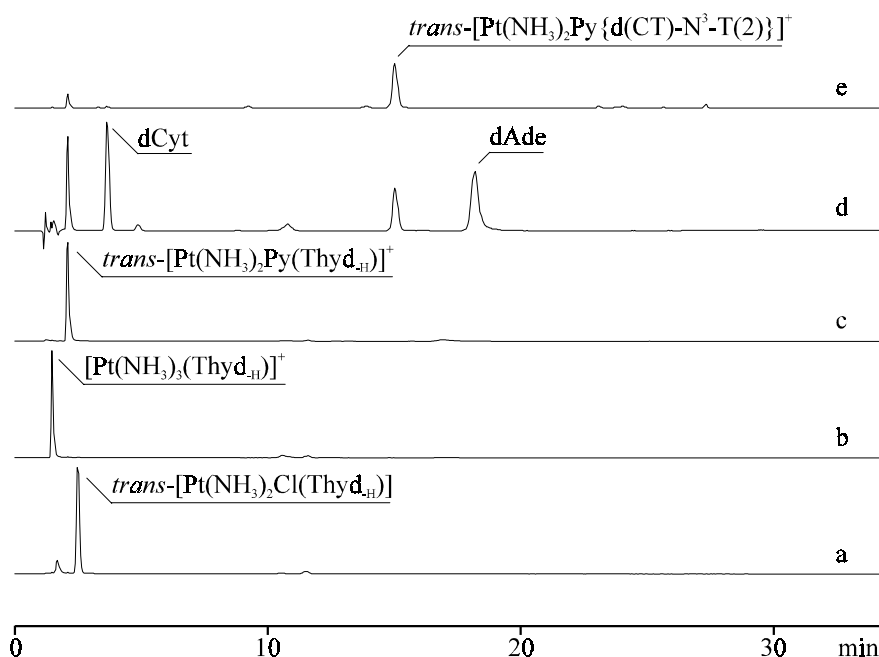


Abb. 41: HPL-Chromatogramme von a) *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)], b) [Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup>, c) *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup>, d) unter Verwendung des Bromoisomers des platinieren Synthesebausteines „Pt-T“ synthetisiertes und mit 0.18 M Natronlauge entblocktes d(CXCA) (X = Pt-T) nach enzymatischer Hydrolyse und e) *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CT)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup>

Eine weitere Charakterisierung dieser beiden isolierten platinieren Oligonucleotide erfolgte durch Behandlung mit CN<sup>-</sup> für 24 Stunden bei 50°C. Dabei werden diese Oligonucleotide deplatiniert. Vor allem die sehr gute Übereinstimmung der Retentionszeit des deplatinierten 4-

mers mit der des als Vergleich synthetisierten 4-mers d(CTCA) bestätigt das Vorliegen dieser Sequenz bei dem platinieren Produkt (Abb. 42).

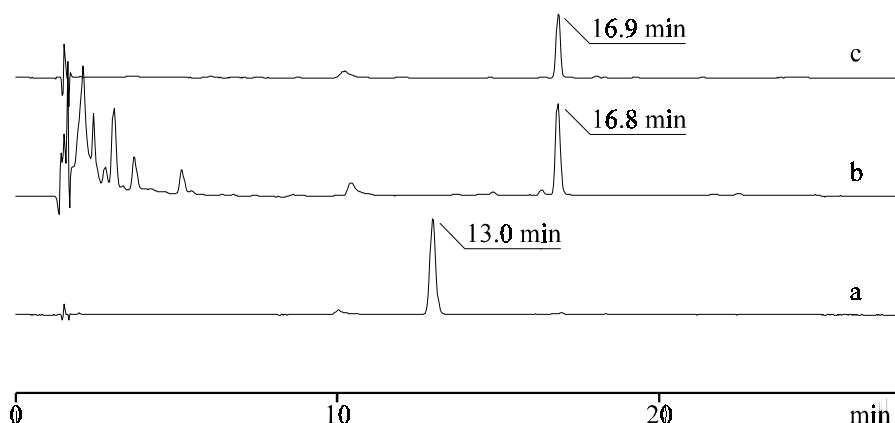


Abb. 42: HPL-Chromatogramme von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTCA)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup> a) vor und b) nach Behandlung mit 0.3 M CN<sup>-</sup> für 24 h bei 50°C sowie von c) d(CTCA)

Doch auch bei dem platinieren 12-mer stellt die sehr gute Übereinstimmung der Retentionszeit nach Deplatinierung mit der des entsprechenden unmodifizierten 12-mers einen Hinweis für die Übereinstimmung der Sequenzen dar (Abb. 43).

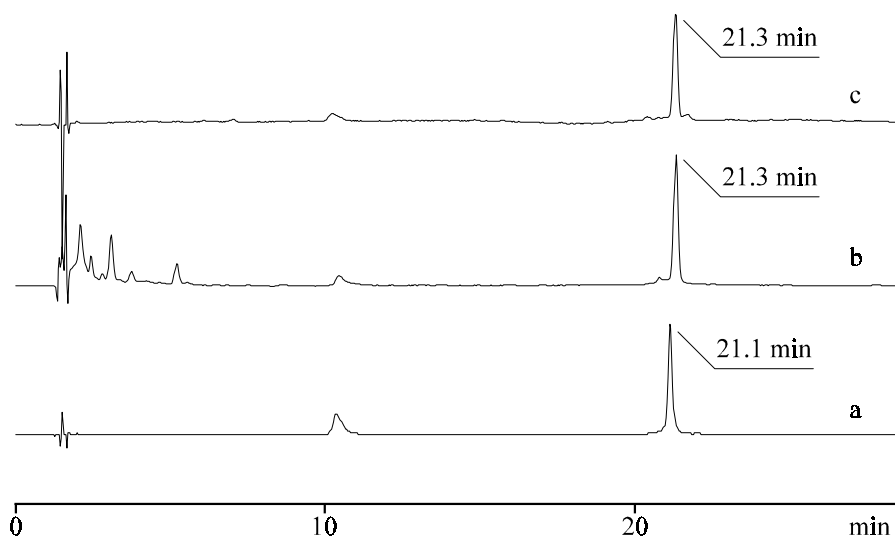


Abb. 43: HPL-Chromatogramme von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> a) vor und b) nach Behandlung mit 0.3 M CN<sup>-</sup> für 24 h bei 50°C sowie von c) d(ATAGTATACAGA)

Der in allen Chromatogrammen in den Abb. 42 und Abb. 43 erkennbare breite Peak bei 10 - 11 min ist in anderen, hier nicht dargestellten HPL-Chromatogrammen sowohl der unmodifizierten als auch der platinieren Oligonucleotide nicht beobachtet worden und kann daher unbeachtet bleiben. Eine mögliche Ursache dafür ist eine Verunreinigung der Vorsäule. Diese Untersuchungen wurden auch in denaturierenden Polyacrylamid - Gelen durchgeführt. Beide platinieren Oligonucleotide (Bahn 1, Abb. 44, Bild A bzw. B) zeigen einen deutlichen

„shift“ gegenüber den unplatinierten Oligonucleotiden (Bahn 3, Abb. 44, Bild A bzw. B), der nach Cyanidbehandlung (Bahn 2, Abb. 44, Bild A bzw. B) nicht mehr zu beobachten ist.

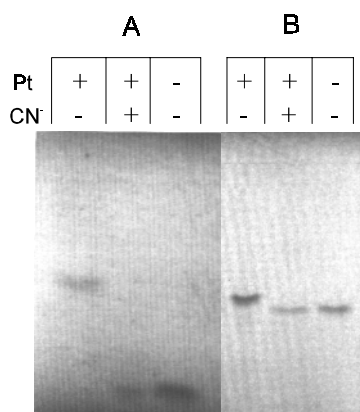


Abb. 44: Gelelektrophorese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTCA)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup> vor (Bahn 1, Bild A) und nach Deplatinierung mit CN<sup>-</sup> (Bahn 2, Bild A) sowie von d(CTCA) (Bahn 3, Bild A), von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> vor (Bahn 1, Bild B) und nach Deplatinierung mit CN<sup>-</sup> (Bahn 2, Bild B) sowie von d(ATAGTATACAGA) (Bahn 3, Bild B) in 20 % Acrylamid/Bisacrylamid + 7 M Harnstoff

Diese Untersuchungen zeigen einerseits die Modifizierung der platinierten Oligonucleotide und bestätigen andererseits (nach Deplatinierung) die erwartete Länge der platinmodifizierten Oligonucleotide.

### ***Bestimmung der Position der Platinmodifizierung am Oligonucleotid durch Sequenzierung nach Sanger***

Zur genauen Charakterisierung der platinierten Oligos in Bezug auf die Position der Platinierung, was bei längeren platinierten Oligonucleotiden mit *intrastrand - crosslinks* von besonderer Bedeutung ist, sollte die Eigenschaft der Platinmodifizierung genutzt werden, Enzyme wie z.B. Polymerasen am Voranschreiten an der DNA bzw. am Oligonucleotid zu hemmen (E. Holler) [22]. Aus 3'-Richtung sollte dies durch enzymatische Sequenzierung nach Sanger erfolgen. Für die Bestimmung der Platinierungsseite 5'-wärts wurde angedacht, nach Markierung des zu untersuchenden Oligos am 3'-Ende, z.B. durch Ligation mit O<sup>5</sup>-{<sup>32</sup>P}-Cytidin-3',5'-diphosphat (p\*Cp), einen 5'-Exonucleaseverdau mit Kalbsmilz-Exonuclease durchzuführen, diese Untersuchung erfolgte jedoch nicht.

Für die enzymatische Sequenzierung nach Sanger wird das zu sequenzierende Oligonucleotid am 3'-Ende mit einem komplementären, relativ kurzen, am 5'-Ende z.B. mit Fluoreszein markierten Oligonucleotid, dem Primer, hybridisiert (Abb. 45). Mit einer Polymerase wird nun, ausgehend von dem doppelsträngigen Abschnitt, der komplementäre Gegenstrang synthetisiert. In vier getrennten Reaktionsansätzen wird neben allen vier 2'-Desoxynucleosid-

5'-triphosphaten zusätzlich jeweils ein 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat (ddNTP) zugegeben. Wird ein ddNTP eingebaut, entsteht ein Abbruchfragment, da die 3'-OH - Gruppe fehlt, die zur weiteren Reaktion notwendig ist. Durch gelelektrophoretische Auftrennung der vier entstandenen Gemische aus unterschiedlich langen Abbruchfragmenten unter denaturierenden Bedingungen kann man auf die Sequenz des sequenzierten Oligonucleotides schließen. Diese Detektion erfolgte hier mit Hilfe eines Laser - Fluoreszenz - Detektors (A.L.F.) der Firma Pharmacia.

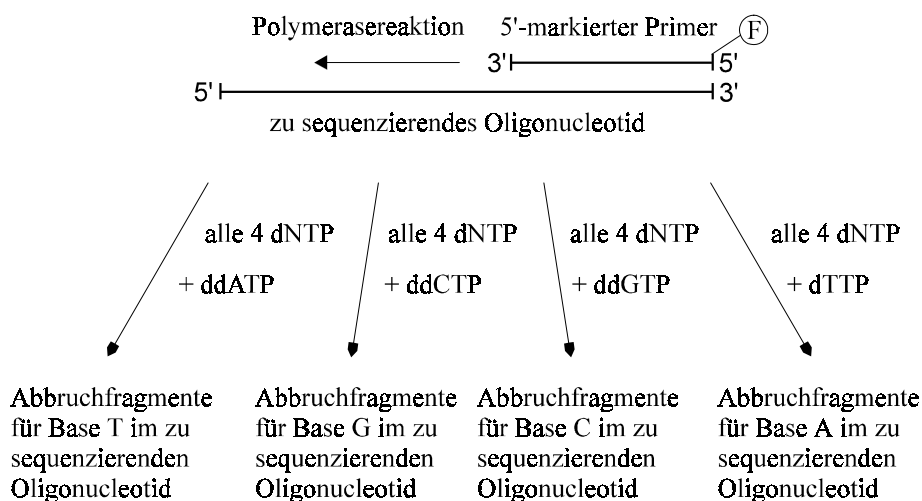


Abb. 45: Prinzip der Sequenzierung nach Sanger [65]

Für die Sequenzierung nach Sanger [65] war es folglich notwendig, das zu untersuchende Oligonucleotid mit einer dem zu verwendenden Primer komplementären Sequenz am 3'-Ende zu verlängern. Für diesen Zweck erfolgte die Synthese eines am 5'-Ende phosphorylierten 40-mers.

Die Phosphorylierung der 5'-Position kann sowohl enzymatisch mit Kinase als auch chemisch erfolgen. Zweckmäßig ist die chemische Phosphorylierung des synthetisierten Oligonucleotides am Ende der Festphasensynthese. Hierfür existieren verschiedene Reagenzien. Mit Hilfe des Amidit - Verfahrens kann dies durch Ankupplung von Bis(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit erfolgen, bei Anwendung des H-Phosphonat - Verfahrens sind 2-Cyanoethyl-H-phosphonat [46], 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-H-phosphonat [47] und 2-(2-(4-Methoxytrityloxy)ethylsulfonyl)ethyl-H-phosphonat [66] aus der Literatur bekannt. Aus Zeitgründen wurde hier versucht, das sich noch am Träger befindliche Oligonucleotid durch Reaktion mit (vorhandenem) Salicyloylchlorophosphit (**49**) (vgl. Abb. 31) und nachfolgender Oxidation zu phosphorylieren (Abb. 47). Hintergrund dieser Synthese ist die Tatsache, daß die Triphosphorylierung nach Ludwig und Eckstein [67] an fester Phase durchgeführt [68] als größtes Nebenprodukt zum entsprechenden Monophosphat führt [69]. Dies ist auf den hierbei nicht vollständig stattfindenden Austausch des Salicylates durch Pyrophosphat zurückzuführen.

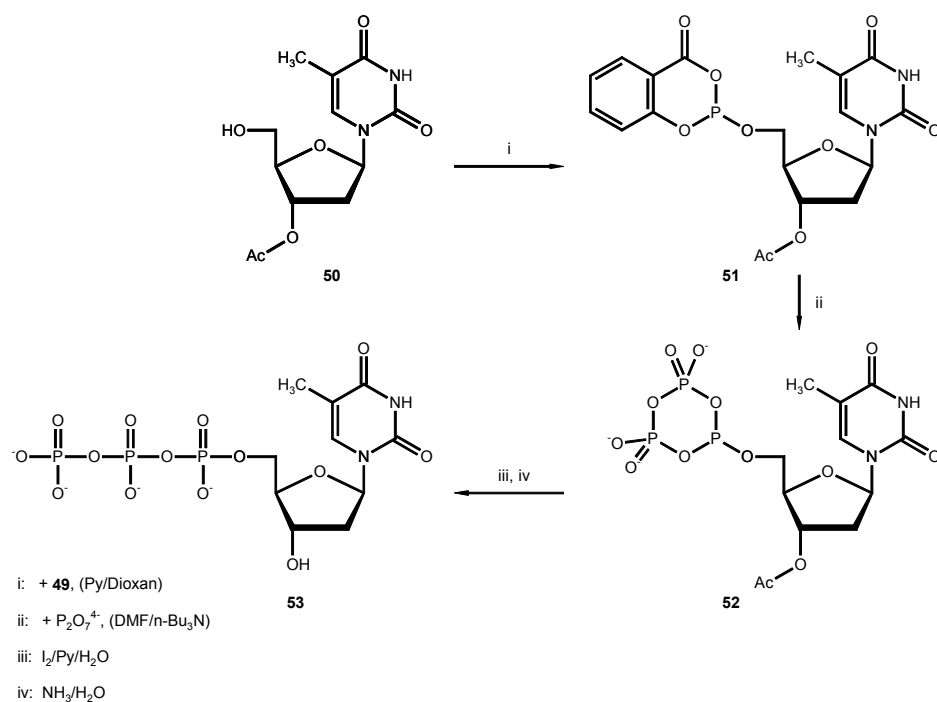


Abb. 46: Synthese von Thymidin-5'-triphosphat nach *Ludwig* und *Eckstein* [67]

Führt man diesen Reaktionsschritt (Abb. 46, (ii)) nicht durch, sollte das entsprechende Monophosphat **58** entstehen (Abb. 47).

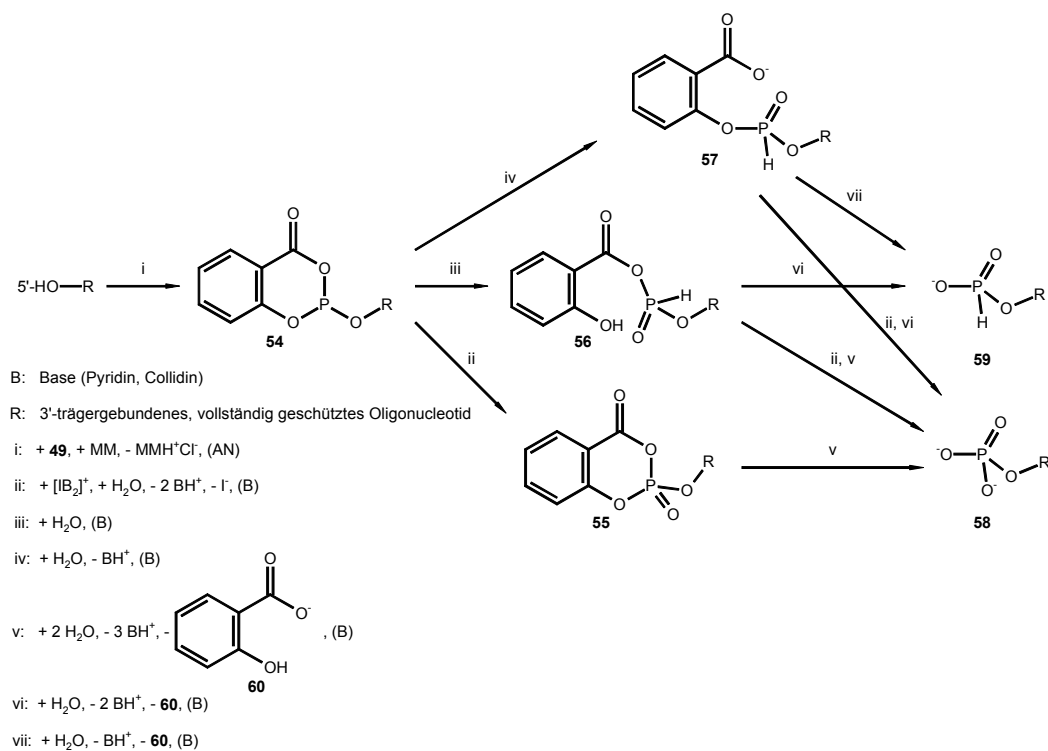


Abb. 47: Reaktionsschema der Phosphorylierung eines vollständig geschützten Oligonucleotides durch Umsetzung mit Salicyloylchlorophosphit (**49**) und nachfolgender Oxidation mit I<sub>2</sub>/Base/H<sub>2</sub>O

Die spätere Untersuchung dieser Methode an dem 5-mer (T)<sub>5</sub> zeigte nach Analyse mit Ionenaustausch - HPLC (iHPLC) für zwei verschiedene Oxidationslösungen eine deutlich verschiedene Produktverteilung (Abb. 48). Verwendet wurde einerseits die Pharmacia - Oxidationslösung<sup>9</sup> (zur Oxidation der Phosphittriester bei Anwendung des Amidit - Verfahrens) und 2 % Iod in Py/H<sub>2</sub>O = 98/2. Bei Verwendung der Pharmacia - Oxidationslösung entsteht hauptsächlich das phosphonylierte Produkt, d.h. (T)<sub>5</sub>-5'-H-phosphonat (**59**) (Abb. 47). Dies ist aus Abb. 48b ersichtlich. In geringer Menge entsteht auch das gewünschte 5'-phosphorylierte Oligonucleotid **58**, wie der Vergleich mit Abb. 48c zeigt.

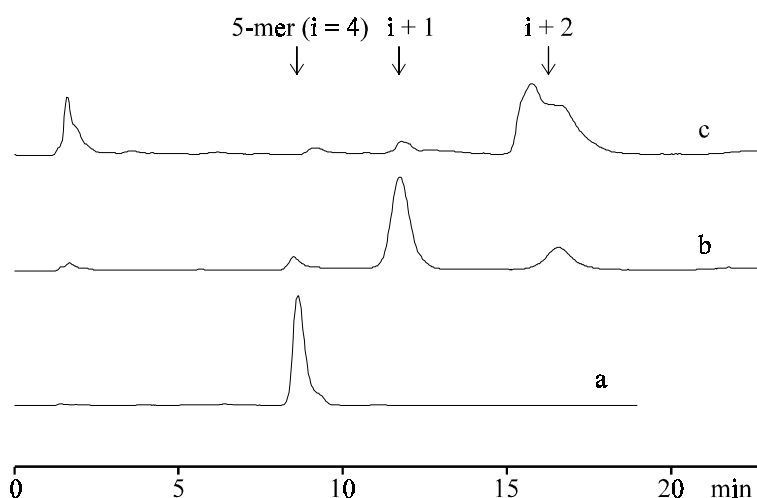


Abb. 48: iHPLC-Chromatogramme a) von (T)<sub>5</sub> sowie von (T)<sub>5</sub> nach 5'-Phosphitylierung mit Salicyloylchlorophosphit (**49**) und Oxidation b) mit Pharmacia - Oxidationslösung<sup>9</sup> bzw. c) mit 2% I<sub>2</sub> in Py/H<sub>2</sub>O = 98/2

Die bevorzugte Bildung des (T)<sub>5</sub>-H-phosphonates (**59**) ist erklärbar durch den großen Wassergehalt dieser Oxidationslösung (30 % Wasser). Erfolgt die Hydrolyse schneller als die Oxidation, entsteht das entsprechende H-Phosphonat **59** (Abb. 47). Dieses wird unter diesen Bedingungen nicht mehr zum Phosphat oxidiert [42][43] [70]<sup>10</sup>. Erfolgt die Oxidation mit 2 % Iod in Pyridin/Wasser = 98/2, entsteht als Hauptprodukt (T)<sub>5</sub>-5'-phosphat (Abb. 48c). Dies bestätigt sich, wenn man die Produkte der in Abb. 48 dargestellten Chromatogramme zusätzlich mit RP-HPLC untersucht (Abb. 49).

<sup>9</sup> 0.5 % Iod in AN/H<sub>2</sub>O/Coll = 64/30/6

<sup>10</sup> Die Oxidation eines H-Phosphonates zum Phosphat ist von Tarussova *et al.* beschrieben [70]. Sie oxidierten Ammonium-2'-desoxyguanosin-5'-H-phosphonat mit einer Lösung von 1.7 % KOH und 0.158 % KMnO<sub>4</sub> in Wasser für 15 Stunden bei 0°C. Dabei wurde das entsprechende 5'-Phosphat mit 55 % Ausbeute isoliert.



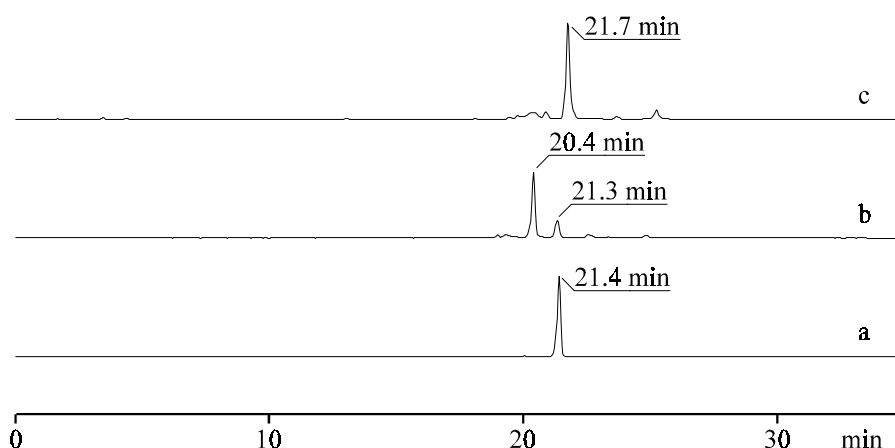


Abb. 49: HPL-Chromatogramme a) von (T)<sub>5</sub> sowie von (T)<sub>5</sub> nach 5'-Phosphitylierung mit Salicyloylchlorophosphit (**49**) und Oxidation b) mit Pharmacia - Oxidationslösung<sup>9</sup> bzw. c) mit 2% I<sub>2</sub> in Py/H<sub>2</sub>O = 98/2

Das RP-HPL-Chromatogramm des nach 5'-Phosphitylierung mit der Pharmacia - Oxidationslösung<sup>9</sup> behandelten 5-mers zeigt erwartungsgemäß für das Hauptprodukt mit 20.4 min (Abb. 49b, vgl. auch Abb. 48b) eine kleinere Retentionszeit als das Vergleichsoligonucleotid (T)<sub>5</sub> (Abb. 49a), das bei 21.4 min erscheint. Das in gleicher Weise phosphitylierte, jedoch mit 2% Iod in Pyridin/Wasser = 98/2 oxidierte Oligonucleotid (T)<sub>5</sub> (Abb. 49c) erscheint dagegen bei geringfügig größerer Retentionszeit (21.7 min). Dies ist durch den Ionenpaar - Effekt erklärbar, der bereits bei dem vorliegenden pH-Wert der HPLC - Untersuchung von pH = 6.5 zu erwarten ist (Thyd-5'-phosphat: pK<sub>a1</sub> = 1.6, pK<sub>a2</sub> = 6.5 [34]). Dieser kann bei unpolaren Gegenionen wie Triethylammoniumkationen zu größeren Retentionszeiten als bei Anwesenheit polarerer Gegenionen wie Natriumkationen oder auch Ammoniumkationen führen. Aus gleichem Grund ist die Fehlertoleranz unter RP-HPLC - Bedingungen unter diesen Umständen größer als sonst üblich, da vorhandene Gegenionen während des Eluierens nicht vollständig gegen die im HPLC - Puffer vorhandenen austauschen müssen. Praktisch ist (T)<sub>5</sub> von 5'-phosphoryliertem (T)<sub>5</sub> unter diesen HPLC - Bedingungen nicht zu unterscheiden, wie durch das in Abb. 49b dargestellte Chromatogramm bestätigt wird (vgl. Abb. 48b). Dennoch deuten die aufgenommenen Chromatogramme darauf hin, daß die Phosphitylierung an der 5'-Position mit Salicyloylchlorophosphit und nachfolgender Oxidation von 2% Iod in Pyridin/Wasser = 98/2 mit guter Ausbeute zur Bildung des phosphorylierten Oligonucleotides führt. Diese Ergebnis muß jedoch unter Vorbehalt betrachtet werden, da eine Verifizierung der Methode bei Oxidation mit 2 % Iod in Pyridin/Wasser = 98/2 nicht erfolgt ist. Andererseits muß aber auch gesagt werden, daß dies das bereits zitierte Ergebnis von *Schötzau* [69] nur bestätigt und daher nicht überraschend ist.

Nach Synthese des 5'-phosphorylierten 40-mers mußte nun die Ligation mit dem zuvor synthetisierten platinieren 12-mer durchgeführt werden. Das Prinzip der Ligation ist schematisch in Abb. 50 dargestellt.

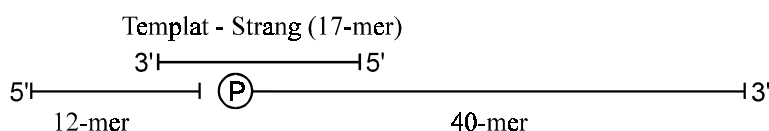


Abb. 50: Schematische Darstellung der Ligation

In Gegenwart eines Templat - Stranges, der überlappend mit beiden zu ligierenden Oligos komplementär ist, erfolgte die Ligation mit T4-DNA-Ligase. Dabei ist das verwendete 40-mer am 3'-Ende komplementär zu dem Primer, der für die spätere Polymerasereaktion Verwendung findet. Für die hier dargestellte Ligation wurde das 40-mer wie zuvor beschrieben mit Salicyloylchlorophosphit umgesetzt und nachfolgend mit der Pharmacia - Oxidationslösung oxidiert, die in Abb. 48 dargestellte Abhängigkeit der Anteile von entstehendem phosphonyliertem und phosphoryliertem Oligonucleotid vom Oxidationsreagenz war zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar. Entsprechend wurde trotz 3-fachem Überschuß an eingesetztem 40-mer nur ein Teil der eingesetzten 12-mere d(ATAGTATACAGA) und d(ATAGTAXACAGA) ( $X = \text{trans-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py}(\text{N}^3\text{-T})]^+$ ) ligiert (Abb. 51).

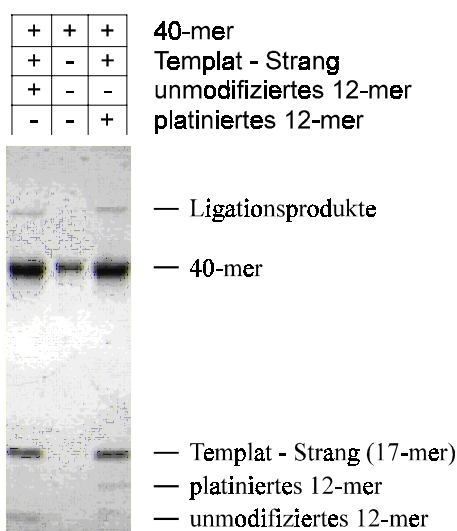


Abb. 51: 12% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der Ligation des 5'-phosphorylierten d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) und d(ATAGTAXACAGA) ( $X = \text{T}$ : Bahn 1,  $X = \text{trans-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py}(\text{N}^3\text{-T})]^+$ : Bahn 3) in Gegenwart von d(AGCTTGCATGCCTCTGT) als Templat - Strang mit T4-DNA-Ligase sowie von d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) (Bahn 2)

Dies zeigen die deutlich erkennbaren Banden der 12-mere in Abb. 51. Die geringen Ausbeuten an Ligationsprodukten von ca. 30 % erklären sich dadurch, daß nur das phosphorylierte 40-mer reagiert hat. Die erhaltenen Mengen an Ligationsprodukten waren jedoch ausreichend für die Sequenzierungen, eine Wiederholung der Ligation mit einem vollständig phosphorylierten 40-mer erfolgte daher nicht.

Für die Sequenzierung nach *Sanger* [65] wurde T7 DNA - Polymerase verwendet, die Detektion der Sequenzierung erfolgte an einem A.L.F. der Firma Pharmacia. Es wurde mit

dem 5-Fluo-M13mp18 universal primer (26-mer) gearbeitet, dessen Sequenz wie bereits erwähnt mit den ersten 26 Basen vom 3'-Ende aus des bei der Ligation verwendeten 40-mers komplementär ist. Alle Methoden erfolgten wie im Manual für den Sequenzer (*Pharmacia*) beschrieben. Die üblichen Terminationsgemische<sup>11</sup> von je einem 2',3'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphat und den vier 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphaten im Verhältnis von 1/200 können jedoch nicht verwendet werden. Es erfolgten Versuche mit Terminationsgemischen im Verhältnis von 1/20, 1/10 und 1/5.

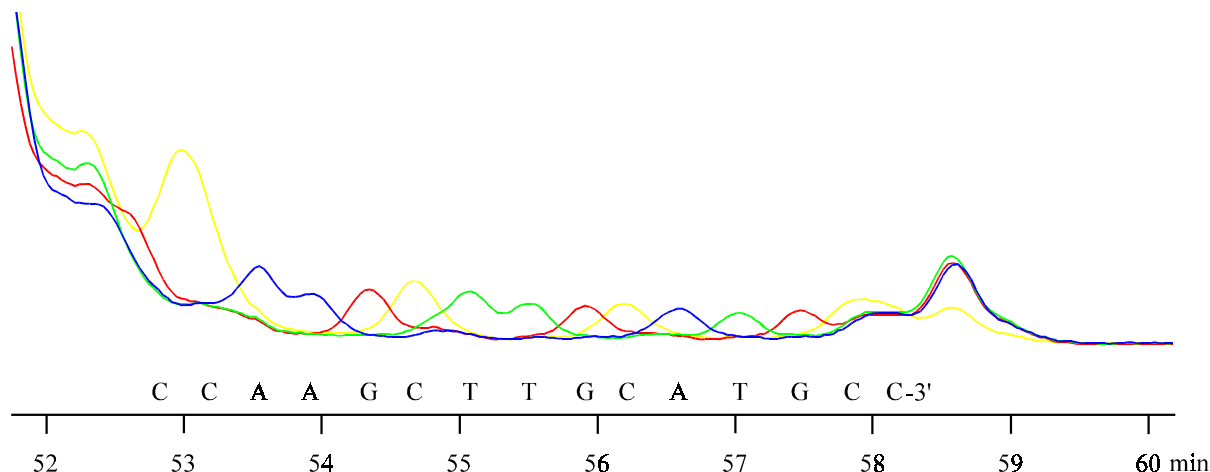


Abb. 52: Detektion der Sequenzierung von d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) nach *Sanger* mit T7 DNA - Polymerase unter Verwendung der Terminationsmische 1/5 und Abbruch der Polymerasereaktion nach 5 min am A.L.F.

Die besten Ergebnisse wurden bei Verwendung der Terminationsmische im Verhältnis von 1/5 erzielt (Abb. 52), daher fanden diese Terminationsgemische bei allen durchgeführten Sequenzierungen Anwendung. Von dem sequenzierten 40-mer sind die letzten 13 Basen, d.h. selbst die letzte Base am 5'-Ende des Templatstranges, noch sicher lesbar (vgl. auch Abb. 53). Die gelesenen Basen sind jeweils unter die einzelnen Maxima aufgeschrieben. Die Sequenzierung des Ligationsproduktes von d(ATAGTATACAGA) und dem 40-mer erlaubt, neben mehreren Basen des 40-mers alle 12 Basen des betreffenden 12-mers zu lesen (Abb. 53). Unter die gelesenen Basen wurde hier zusätzlich für die letzten 12 Basen die jeweils komplementäre Base aufgeschrieben, diese Sequenz entspricht wieder der Sequenz des bei der Ligation mit dem 5'-phosphorylierten 40-mer eingesetzten unmodifizierten 12-mers, jedoch in umgekehrter Reihenfolge, wie die Basen von der Polymerase auch gelesen werden. Alle Sequenzierungen wurden parallel in zwei getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt und nach 1 bzw. 5 Minuten abgebrochen. Dabei wurden stets übereinstimmende Ergebnisse erzielt.

<sup>11</sup> molares Verhältnis von ddNTP zu dNTP

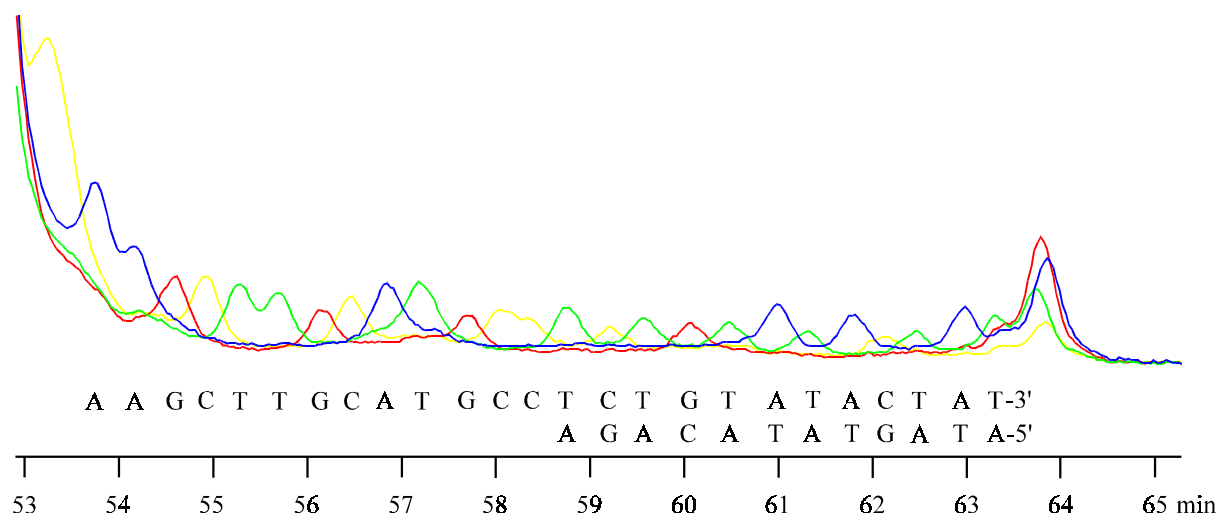


Abb. 53: Detektion der Sequenzierung von d(ATAGTATACAGAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) nach Sanger [65] mit T7 DNA - Polymerase unter Verwendung der Terminationsmische 1/5 und Abbruch der Polymerasereaktion nach 1 min am A.L.F.

Die Sequenzierung des Ligationsproduktes des an Position 7 (des ehemaligen 12-mers ebenso wie des Ligationsproduktes) befindlichen  $trans\text{-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py}(\text{N}^3\text{-T})]^+$  bricht erwartungsgemäß genau an der Position des sich befindenden Platinkomplexes ab und führt nicht wie im Falle der unmodifizierten Oligonucleotide bis zum 5'-Ende des gelesenen Stranges (Abb. 54, vgl. Abb. 53).

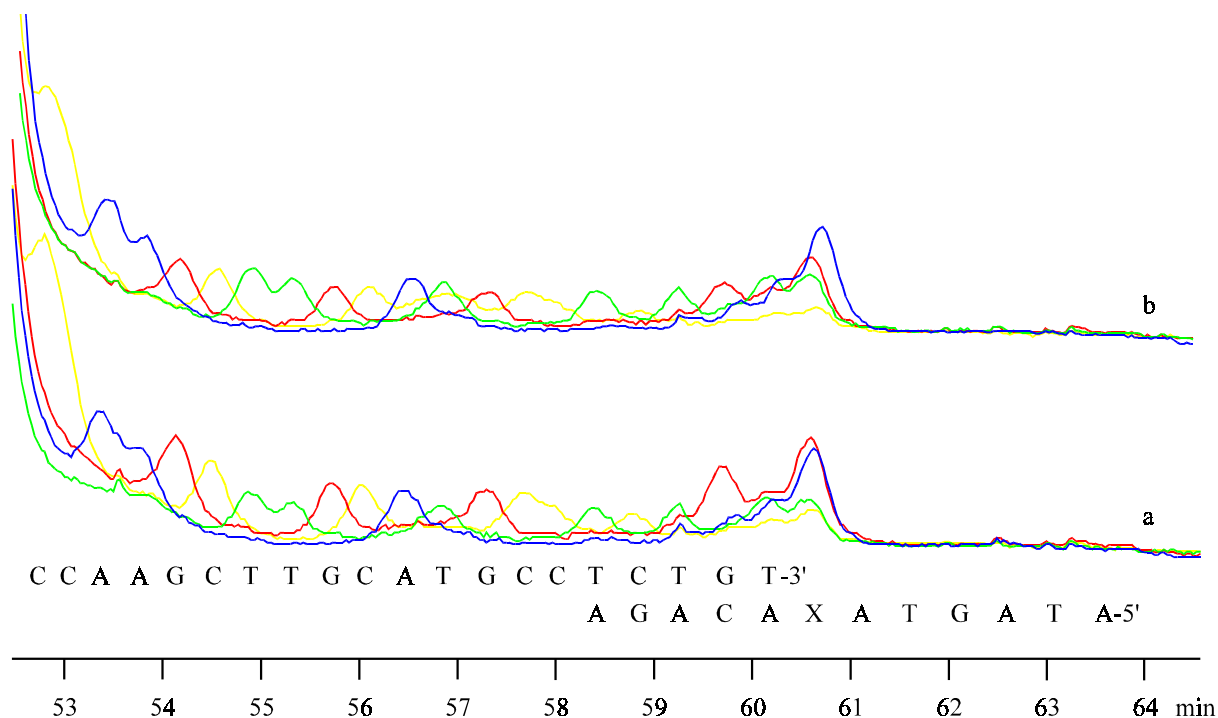


Abb. 54: Detektion der Sequenzierung von d(ATAGTAXACAGAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) (X =  $trans\text{-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py}(\text{N}^3\text{-T})]^+$ ) nach Sanger mit T7 DNA - Polymerase unter Verwendung der Terminationsmische 1/5 und Abbruch der Polymerasereaktion a) nach 5 min und b) nach 1 min am A.L.F.

Dies zeigen beide durchgeführten Sequenzierungen, auch hier wurde kein Unterschied zwischen den Sequenzierungen mit unterschiedlich terminierten Polymerasereaktionen festgestellt (Abb. 54a und Abb. 54b). Die letzte Base der in Abb. 54a dargestellten Sequenzierung ist auf den ersten Blick nicht eindeutig als T zu identifizieren, integriert man jedoch alle vier Kurven in dem entsprechenden Abschnitt, ergibt sich für die Base T die deutlich größte Fläche. Nach der letzten Base ist stets ein weiterer Peak (Abbruchpeak) sichtbar. Dieser wurde stets beobachtet, d.h. auch im Falle unmodifizierter Oligonucleotide, wie Abb. 52 und Abb. 53 zeigen. Daher ist es nicht verwunderlich, daß diese Erscheinung auch im Falle des Abbruchs durch eine Platinmodifizierung beobachtet wird (Abb. 54), eine Zuordnung zur Base „X“ wäre daher unsinnig.

Der Abbruch der Sequenzierung an genau der Position, wo das platierte Thymidin während der Synthese in das Oligonucleotid eingebaut worden ist, bestätigt die für das Produkt angegebene Position der Platinmodifizierung. Eine Platinisomerisierungsreaktion, bei der das Thymidin deplatiert und eine andere Position platiert wird, findet erwartungsgemäß nicht statt. Weiterhin konnte mittels *Sanger* - Sequenzierung gezeigt werden, daß die an T angebundene *trans*-{Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py}<sup>2+</sup> - Platinspezies T7 DNA - Polymerase blockiert.

Der erfolgreiche Einbau des platierten Thymidins während der Festphasensynthese eines Oligonucleotides stellt ein wichtiges Zwischenziel bei der Realisierung der Aufgabenstellung dar. Nächstes zu realisierendes Ziel ist Ausbildung eines *intrastrand-crosslinks* nach erfolgreicher Einführung des platierten Thymidins.

## 7 Synthese von Oligonucleotiden nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Änderung der Base im Lösungsmittel

### 7.1 Voruntersuchungen zur Reaktivität verschiedener organischer Basen gegenüber einem Chloroplatinkomplex

Wie in Abschnitt 6.3 gezeigt wurde, führt die Einführung eines Chloro- bzw. Bromoplatinkomplexes bei Anwendung der Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese von Oligonucleotiden zu der betreffenden Pyridin - koordinierten Platinspezies. Die hohe Bindungsstärke des Pyridins an Platin(II) - Komplexen [51] macht es notwendig, das Pyridin als Bestandteil des Lösungsmittelgemisches der H-Phosphonat - Synthese zu ersetzen.

In diesem Zusammenhang erfolgten Voruntersuchungen zur Reaktivität von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] (**61a**) gegenüber Pyridin. Die zu Vergleichszwecken durchgeführte Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] (**61a**) erfolgte analog zu der von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) (Abb. 20, statt DMTr hier jedoch H). Dabei wurde zu 60 % *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] erhalten. Aus dem <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum geht hervor, daß die Verbindung zu 20 mol% DMF enthält. Die Charakterisierung des Produktes erfolgte mit Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR - Spektroskopie und chromatographisch (Abb. 56a, Abb. 57b).

*Trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] (**61a**) wurde unter verschiedenen Bedingungen mit Pyridin zur Reaktion gebracht, dabei wird *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>H</sub>)]Cl (**61e**) gebildet (Abb. 55).

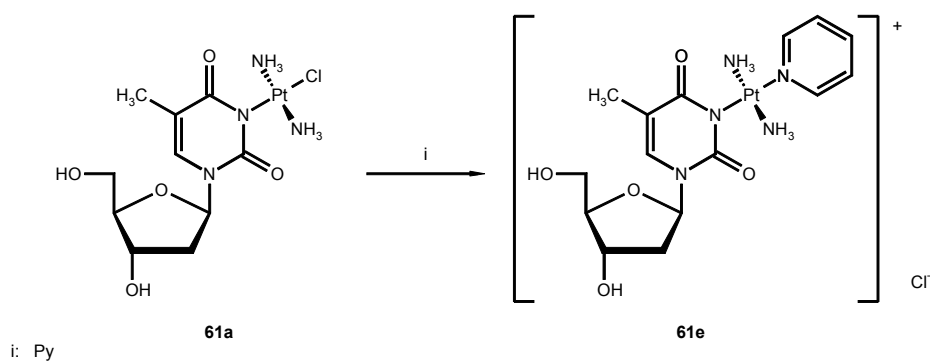


Abb. 55: Reaktion von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] (**61a**) mit Pyridin

Läßt man *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] (**61a**) 30 Minuten bei 50°C mit Pyridin reagieren, so entsteht ein Gemisch von Chloro- und Pyridinform des Komplexes (Abb. 56c). Ein zweimaliges Codestillieren mit Pyridin, wie es vor dem Beladen des Syntheseautomaten mit dem platinieren H-Phosphonat durchgeführt wurde, ergibt nahezu quantitativ die Chlorokomplexform (Abb. 56b), eine Reaktion über 30 Minuten mit Pyridin bei 90°C führt dagegen nahezu quantitativ zur Pyridin - koordinierten Komplexform (Abb. 56d).

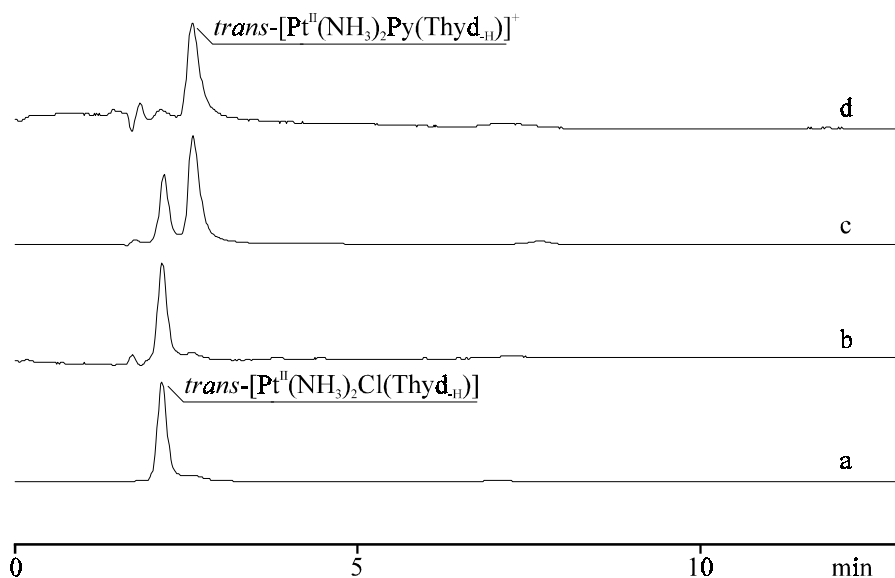


Abb. 56: HPL-Chromatogramme a) von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$  (**61a**), b) nach zweimaliger Codestillation mit Pyridin, c) nach 30 min Reaktion mit Pyridin bei 50°C sowie d) nach 30 min Reaktion mit Pyridin bei 90°C

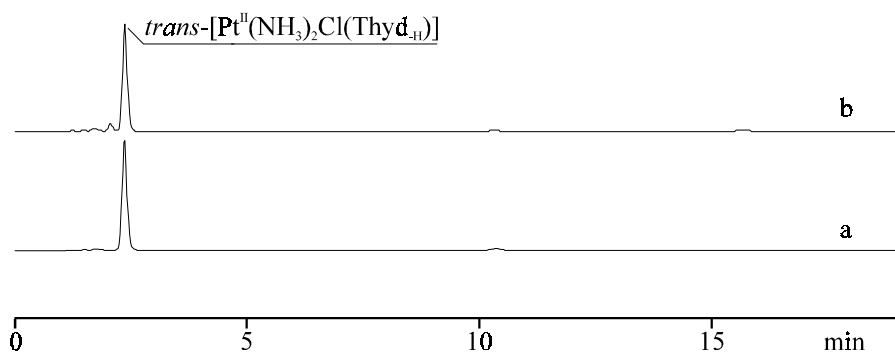


Abb. 57: HPL-Chromatogramme a) der Produkte der Reaktion von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$  (**61a**) mit N,N-Diethylanilin für 30 min bei 90°C sowie b) von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$  (**61a**)

Zunächst wurden Basen auf ihre Reaktivität gegenüber  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$  (**61a**) untersucht, die nur eine sehr geringe Nucleophilie besitzen.

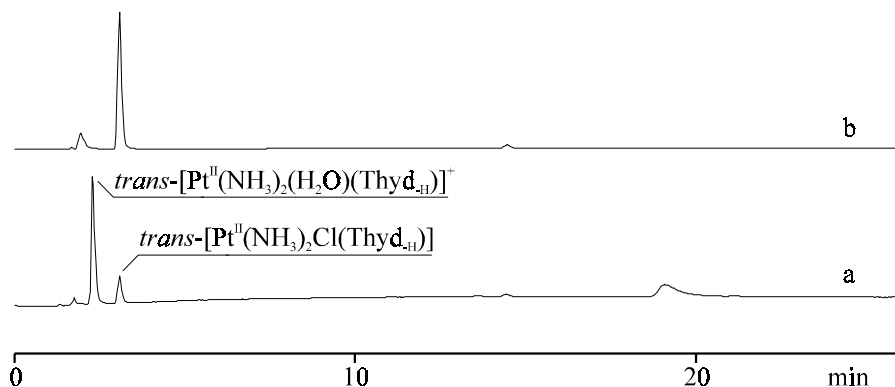


Abb. 58: HPL-Chromatogramme a) von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$  (**61a**) (größtenteils hydrolysiert) sowie b) der Produkte der Reaktion von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_{-H})]$  mit N-Methylmorpholin für 30 min bei 90°C

Sowohl für N-Methylmorpholin als auch für N,N-Diethylanilin zeigen die Chromatogramme (Abb. 57a und Abb. 58b) nach Reaktion über 30 min bei 90°C im Gegensatz zur Reaktion in Pyridin (Abb. 56d) keinen Hinweis auf einen direkten Austausch gegen den Chloroliganden am Platin. Da  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]$  für die Aufnahme der HPL-Chromatogramme in sehr verdünnter wäßriger Lösung vorliegt, ist infolge Hydrolyse des Chloroliganden stets eine mehr oder weniger große Menge des polareren  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{O}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]^+$  anwesend (vgl. Abschnitt 2). Nach ausreichend langer Zeit bei Raumtemperatur liegt größtenteils die hydrolysierte Form vor (Abb. 58a). Der in Abb. 58b bei 1.92 min erkennbare kleine Substanzpeak kann nicht dem Produkt zugeordnet werden, eine Retentionszeit, die noch kleiner als die von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{O}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]^+$  ist, erscheint für das mögliche Produkt, der entsprechenden N-koordinierten N,N-Diethylanilin - Platinspezies, sehr unwahrscheinlich.

Schließlich wurde auf ähnliche Weise 2,6-Lutidin untersucht, dessen nucleophiles Zentrum sterisch etwas abgeschirmt ist. In Analogie zur Umsetzung mit Pyridin (Abb. 55) ist hier  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Lut}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]\text{Cl}$  (**61f**) als Produkt zu erwarten (Abb. 59).

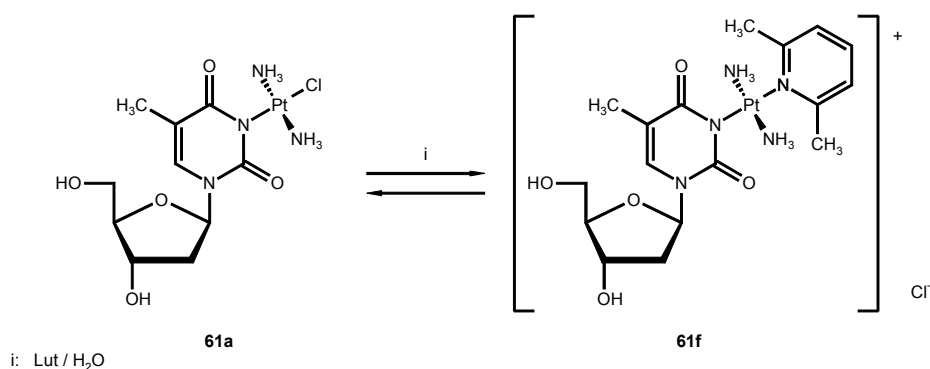


Abb. 59: Reaktion von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]$  (**61a**) mit 2,6-Lutidin

Die HPL-chromatographische Untersuchung zeigt, daß 2,6-Lutidin nach 30 min bei 50°C in nur sehr geringem Maße reagiert (Abb. 60b).

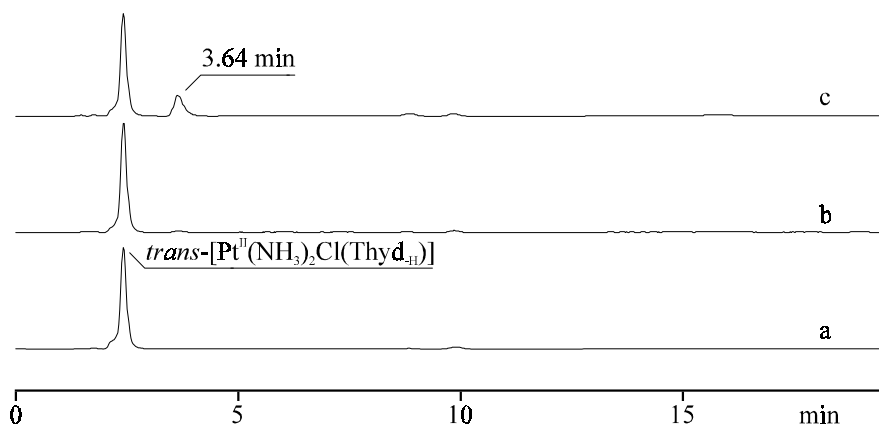


Abb. 60: HPL-Chromatogramme a) von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]$  (**61a**), der Produkte der Reaktion von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{Thyd}_{\text{-H}})]$  mit Lut/H<sub>2</sub>O nach 30 min b) bei 50°C sowie c) bei 90°C

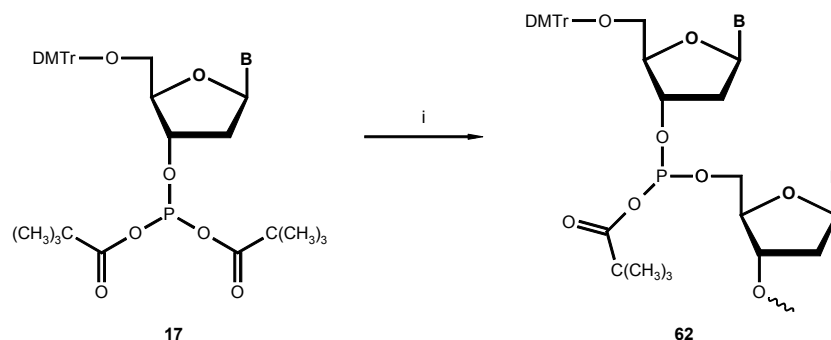


Bei 90°C kann ein Ligandenaustausch mit 2,6-Lutidin beobachtet werden, der bei 3.64 min in Abb. 60c erkennbare Substanzpeak sollte *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Lut(Thyd<sub>-H</sub>)]<sup>+</sup> (**61f**) entsprechen. Der Austausch ist jedoch deutlich geringer, als dies nach Reaktion mit Pyridin über 30 min bei 50°C zu beobachten war (vgl. Abb. 56c). Demnach sollte es möglich sein, unter Anwendung milder Entblockungsbedingungen eine Koordination von 2,6-Lutidin am Platinatom zu verhindern.

Da Platinierungsreaktionen wie die im Anschluß an die Oligonucleotidsynthese durchzuführende *intrastrand-crosslink* - Bildung bei höheren Temperaturen bevorzugt ablaufen, wurden zunächst Untersuchungen mit Basen durchgeführt, die selbst bei höheren Temperaturen keine Reaktion mit dem Chloroplatinkomplex gezeigt haben.

## 7.2 Verwendung von N-Methylmorpholin als Base im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren

Für die Festphasensynthese von Oligonucleotiden nach dem H-Phosphonat - Verfahren unter Verwendung eines Gemisches von AN und N-Methylmorpholin wurden verschieden anteilige Gemische getestet. Hier ist jedoch zu beachten, daß es in Gegenwart stärkerer Basen (als Pyridin) ebenso wie bei Verwendung größerer Mengen an Pivaloylchlorid während des Kupplungsschrittes bevorzugt zur Bildung von Diacylphosphit **17** sowie des gemischten Säureanhydrids **19** kommt (Abschnitt 3, Abb. 10), diese haben deutlich geringere phosphorylierende Eigenschaften [40][71]. Obwohl die Bildung von Phosphorigsäuretriester (Phosphittriester) **18** möglich ist (Abschnitt 3, Abb. 10), ist es nicht anzunehmen, daß dieser Reaktionsverlauf in relevanter Größenordnung stattfindet, da die Trägeranbindung die Diffusion zweier 5'-Hydroxygruppen zueinander einschränkt. Es ist daher zu vermuten, daß das bevorzugte Kupplungsprodukt das gemischte Säureanhydrid **62** darstellt (Abb. 61).



B: (aminogeschützte) Nucleobase

i: + **5**, -  $(\text{CH}_3)_3\text{C-COO}^-$ , -  $\text{MMH}^+$ , (AN/MM)

Abb. 61: Kupplungsreaktion des Diacylphosphits **17** mit der 5'-Hydroxygruppe des bereits synthetisierten Oligomers (**5**)

Während der folgenden Reaktionsschritte (Oxidation und Entblockung) hydrolysiert dieses Säureanhydrid **62** (nach der Oxidation die oxidierte Form) jedoch unspezifisch mit der möglichen Folge eines Strangbruchs. Ein weiteres kupplungsfähiges Intermediat, welches entstehen kann, ist, wie bereits gesagt, das gemischte Säureanhydrid **19**. Dieses kuppelt unter Bildung des Acylphosphondiesters **20** (Abschnitt 3, Abb. 10). Die Bildung eines Nebenproduktes ist hierdurch jedoch wenig wahrscheinlich, da Acylphosphondiesters von Wasser rasch in die betreffende Säure und das entsprechende Phosphondiesters hydrolysiert werden. So reagiert Acetylphosphonsäuredimethylester mit Wasser (basisch katalysiert) zu Essigsäure und Phosphonsäuredimethylester mit einer Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 3$  s bei pH = 7 und 25°C [72]. Man kann folglich davon ausgehen, daß alle entstandenen

Acylphosphondiester **20** während des Oxidationsschrittes am Ende der Synthese (Abschnitt 3, Abb. 9) hydrolysiert und die dabei entstehenden Phosphondiester - Gruppen oxidiert werden.

Bei Verwendung von Anteilen an N-Methylmorpholin unter 10 % während der Kupplungsreaktion zeigten sich schwankende bzw. trotz großer Mengen an dem Aktivierungsreagenz Pivaloylchlorid nur mäßig gute Kupplungsausbeuten, bei einem Gehalt von 25 % wurden gute Kupplungsausbeuten erzielt (nach Abschätzung über Detritylierung). Ein weiterer Aspekt ist das Aktivierungsreagenz. Erst ab der 5-fachen der normalen Konzentration des verwendeten Pivaloylchlorides wurden hohe Kupplungsausbeuten erzielt. Dies bestätigt sich nach Auftrennung über Anionenaustausch - HPLC (Abb. 62b).

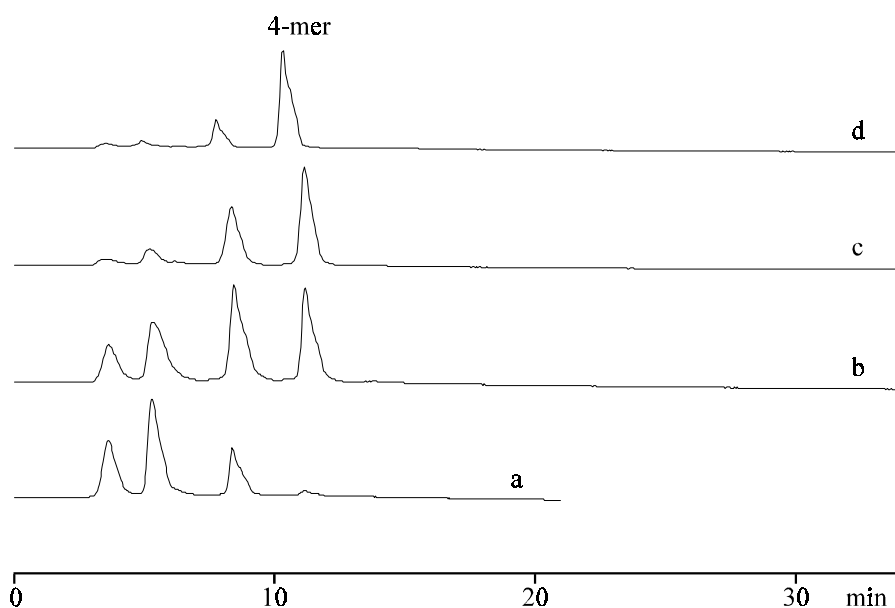


Abb. 62: iHPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthesen von d(GGGA) nach dem H-Phosphonat - Verfahren in MM/AN = 1/3 bei Verwendung a) der 3-fachen und b) der 10-fachen Menge an Piv-Cl als Aktivierungsreagenz nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$ , c) von d(CGGA) nach dem H-Phosphonat - Verfahren in MM/AN = 1/3 bei Verwendung der 10-fachen Menge an Piv-Cl nach Entblockung mit  $\text{NaCl}_{\text{sa}}/25\% \text{NH}_3$  - Lösung, d) von d(TTTA), synthetisiert unter Standardbedingungen

Trotz sehr guter Kupplungsausbeuten im Syntheseprotokoll des synthetisierten 4-mers d(GGGA) findet man auch sehr große Mengen an 3-meren, 2-meren sowie Nucleosid(en), die alle jeweils als ein Peak erkennbar sind. Verwendet man statt der 10-fachen nur die 3-fache Menge an dem Aktivierungsreagenz Pivaloylchlorid, zeigt das Syntheseprotokoll nur mäßige bis schlechte Kupplungsausbeuten (Abb. 62a). Das in Abb. 62a dargestellte iHPL-Chromatogramm bestätigt die im Syntheseprotokoll abgeschätzten schlechten Kupplungsausbeuten, es ist fast kein 4-mer entstanden. Daß sich die unspezifische Hydrolyse der entstandenen Säureanhydride **62** nach Oxidation in die gewünschte Richtung, der Hydrolyse der Säureanhydrid - Bindung, drängen läßt, zeigt das in Abb. 62c dargestellte Chromatogramm. Nach der Oxidation am Ende der Oligonucleotidsynthese wurde das sich noch am Träger befindliche Produkt mit 50 ml einer 0.5 M wäßrigen Lösung von

Natriumchlorid gewaschen und mit einer Lösung von konzentriertem Ammoniak, die bei 30°C mit Natriumchlorid gesättigt wurde, entschützt und vom Träger abgespalten. Verglichen mit dem in Abb. 62b dargestellten Chromatogramm sind nur geringe Mengen Nucleosid(e) und 2-mere erkennbar, aber auch eine geringere Menge an 3-meren. Offensichtlich kommt es nicht zu einer vollständigen Hydrolyse aller entstandenen Säureanhydride **62** bereits während der Oxidation, die bei diesen Untersuchungen mit 2% Iod in Pyridin/Wasser = 98/2 erfolgte, um zusätzliche neue Faktoren auszuschließen.<sup>12</sup> Erst während der Entblockung scheint die vollständige Hydrolyse der dann bereits oxidierten Form der Säureanhydride **62** zu erfolgen. Die während dieses Schrittes anwesenden Alkalimetallkationen führen offensichtlich zur verstärkten Hydrolyse der Säureanhydrid - Bindung. Zum Vergleich ist das iHPL-Chromatogramm von d(TTTA), synthetisiert unter den Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese in Pyridin/Acetonitril = 1/1, nach Entschützung und Abspaltung vom Träger mit konz. Ammoniaklösung dargestellt (Abb. 62d). Obwohl das in Abb. 62d dargestellte Chromatogramm die Produkte einer nicht sehr gut gelungenen Synthese darstellt, ist der Unterschied gegenüber dem in Abb. 62c dargestellten Chromatogramm deutlich erkennbar.

Wenn auch die Oligonucleotidsynthese unter den Bedingungen, wie sie zur Synthese der Produkte des in Abb. 62c dargestellten Chromatogramms verwendet wurden, nur relativ geringe Produktausbeuten erwarten läßt, wurden diese Bedingungen auf die Synthese eines platiniierten Oligonucleotides angewandt, da zu erwarten war, daß die *trans* - Position zu Thymidin am Platin hier nicht durch einen stabilen Liganden ersetzt wird. Unter Verwendung des Bromosynthesebausteines „Pt-T“ **29c** erfolgte die Synthese des 12-mers der Sequenz d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T), die Oxidation am Ende der Festphasensynthese wurde mit 2% Iod in Wasser/TEA/Dioxan = 2/10/88 durchgeführt. Dieses Oxidationsgemisch wurde an einem unmodifizierten 4-mer getestet, d.h. die Oxidation am Ende der Festphasensynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren erfolgte mit diesem Gemisch. Ferner wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie sie für die Synthese verwendet wurden, deren Produkte in Abb. 62b dargestellt sind. Es zeigt sich eine vergleichbare Produktverteilung, dies zeigt, daß das zur Oxidation verwendete Reagenz geeignet ist. Die Entblockung nach Synthese des 12-mers der Sequenz d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) erfolgte mit konz. Ammoniaklösung, die vorher bei 30°C mit Kaliumbromid gesättigt wurde, bei 30°C. In dieser Lösung waren ca. 9 OD Substanz, das Nachwaschen des Trägers mit Wasser ergab weitere 2 OD. Dies wurde hier durchgeführt, da die in der Ammoniaklösung nach Abziehen des Ammoniaks im Vakuum gefundene Substanzmenge trotz der zu erwartenden mäßigen Ausbeute recht gering erschien.

---

<sup>12</sup> Das in der Oxidationslösung vorhandene Pyridin muß natürlich ebenfalls durch eine geeignete Base ersetzt werden.

So wurden zwei Produktfraktionen erhalten, die HPL-Chromatogramme beider Fraktionen sind in Abb. 63a bzw. Abb. 63b dargestellt.

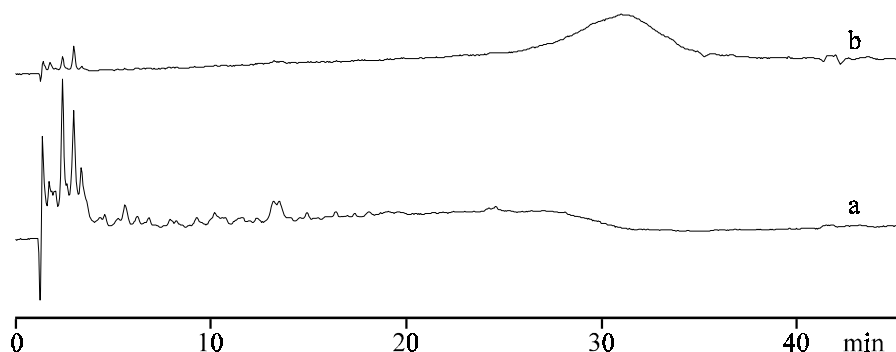


Abb. 63: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) nach Entblockung mit  $\text{KBr}_{\text{sa}}/25\% \text{NH}_3$  unter Verwendung des H-Phosphonat - Verfahrens in N-Methylmorpholin/Acetonitril = 1/3 a) 1. Produktfraktion ( $\text{KBr}_{\text{sa}}/25\% \text{NH}_3$  - Lösung nach Abziehen des  $\text{NH}_3$  i.V.) sowie b) 2. Produktfraktion bei  $60^\circ\text{C}$

Das Chromatogramm in Abb. 63b zeigt das typische Erscheinungsbild von unspezifischen Sekundärstruktureffekten, wie sie für Guanosin - reicher Oligonucleotidsequenzen bekannt sind [73]. Im Falle Guanosin - reicher Oligonucleotide, wo dies auf zusätzliche Wasserstoffbrücken - Bindungen zurückzuführen ist, werden diese unter denaturierenden Bedingungen sowie bei höherer Temperatur zerstört [73]. Das kann hier nicht beobachtet werden, wie die bei  $60^\circ\text{C}$  aufgenommenen Chromatogramme in Abb. 63a und Abb. 63b zeigen. Beide Proben wurden mit Sephadex G-25 entsalzt und gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen untersucht. Das zur Entsalzung verwendete G-25 hat eine Ausschlußgröße von ca. 2500, Substanzen mit einer Molmasse unter 2000 wurden so abgetrennt. Es zeigt sich gleichfalls dieses Erscheinungsbild von unspezifischen Sekundärstruktureffekten, wie sie unter nicht - denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch für Guanosin - reiche Oligonucleotidsequenzen bekannt sind [73]. Auch hier werden die entstandenen Strukturen nicht bzw. nicht vollständig aufgebrochen (Abb. 64).

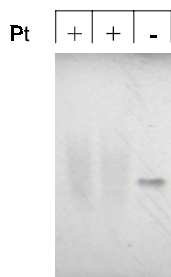


Abb. 64: 20% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der ersten (Bahn 1) sowie der zweiten Produktfraktion (Bahn 2) der Synthese von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) nach Entblockung mit  $\text{KBr}_{\text{sa}}/25\% \text{NH}_3$  und Entsalzung mit Sephadex G-25 unter Verwendung des H-Phosphonat - Verfahrens in N-Methylmorpholin/Acetonitril = 1/3 sowie von d(ATAGTATACAGA) (Bahn 3)

Dies deutet auf eine Beteiligung des Platins an der Entstehung dieser Strukturen hin. Bei einer anderen Synthese erfolgte nach der Oxidation, aber noch vor der Entschützung und Abspaltung von Träger eine Behandlung in 0.01M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) über 24 Stunden bei 50°C, dies sollte zu einer Platinierung von N<sup>7</sup> eines Purines führen (vgl. Abschnitt 2 sowie Abschnitt 4) [11]. Dabei wurde gelelektrophoretisch ein vergleichbares Resultat erzielt.

Die dargestellten Untersuchungen weisen darauf hin, daß ähnliche unspezifische Sekundärstruktureffekte, wie sie für Guanosin - reiche Oligonucleotide bekannt sind, durch Koordination des eingebauten Platinkomplexes auftreten. Da einerseits das Ziel die Synthese von gezielt modifizierten platinieren Oligonucleotiden darstellt und andererseits die Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren unter Verwendung von N-Methylmorpholin als Base den durchgeführten Untersuchungen zufolge über die Bildung von Diacylphosphiten abläuft, wurde N-Methylmorpholin als Ersatz für Pyridin in der H-Phosphonat - Synthese als ungeeignet eingeschätzt.

### 7.3 Verwendung von N,N-Diethylanilin als Base im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren

Als zweite Base mit sehr geringer Nucleophilie wurde N,N-Diethylanilin im Gemisch mit Acetonitril auf die Verwendbarkeit als Ersatz für Pyridin in dem H-Phosphonat - Verfahren untersucht. Ähnlich dem N-Methylmorpholin ( $pK_a = 7.41$  ( $H_2O$ ,  $25^\circ C$ ) [74]  $\rightarrow K_b = 2.57 \cdot 10^{-7}$ ) und dem Pyridin (Basenkonstante in wäßriger Lösung  $1.71 \cdot 10^{-9}$  ( $20^\circ C$ ) [75]) liegt die Basizität von N,N-Diethylanilin im Bereich schwächerer Basen (Basenkonstante in wäßriger Lösung  $3.65 \cdot 10^{-8}$  ( $25^\circ C$ ) [75]). Die Kinetik der Kondensation von  $O^5'$ -DMTr-Thymidin-3'-H-phosphonat (**15d**) mit Ethanol in Gegenwart von Pivaloylchlorid (**16**) in AN/DMA wurde von *Дубей et al.* untersucht [40]. Hierbei hat sich gezeigt, daß die Kupplungsreaktion deutlich langsamer abläuft als in Acetonitril im Gemisch mit Pyridin oder Chinolin. Ursache dafür ist die katalytische Wirksamkeit von Pyridin bzw. Chinolin im zweiten Schritt der Kupplungsreaktion, d.h. der Reaktion des gemischten Säureanhydrides **11** mit der Hydroxykomponente (Abschnitt 3, Abb. 9) [40]. DMA fungiert nicht als Katalysator [40], es ist anzunehmen, daß N,N-Diethylanilin ein ähnliches Verhalten zeigt.

Alle Versuche wurden in einem Gemisch mit dem Verhältnis von N,N-Diethylanilin/Acetonitril = 1/1 durchgeführt. Die Kupplungsprotokolle mehrerer durchgeführter Synthesen kurzer unmodifizierter Oligonucleotide bei Anwendung der normalen Kupplungsbedingungen zeigten in Übereinstimmung mit der getroffenen Annahme keine hohen Kupplungseffizienzen. Daher wurde die Menge an Pivaloylchlorid verdoppelt und die Kupplung in zwei Schritten für je 10 Minuten statt wie bisher in einem Schritt für 2 Minuten durchgeführt, d.h. es wurde zusätzlich mit dem doppelten des normalen Überschusses gearbeitet. In Anlage 6 ist das Protokoll einer solchen Synthese dargestellt. Die Kupplungsausbeuten liegen nach Abschätzung über Detritylierung im Bereich von 60 - 90 %, dies ist für Oligonucleotidsynthesen deutlich zu gering.

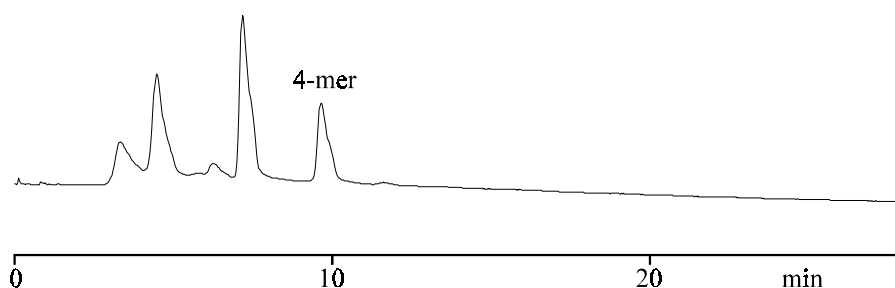


Abb. 65: iHPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von  $(T)_4$ , synthetisiert nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit zweifacher Menge an Aktivierungsreagenz Pivaloylchlorid und doppeltem Substanzaufwand pro Kupplungsschritt in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $NH_3$

Bestätigt werden die schlechten Kupplungsausbeuten durch das in Abb. 65 dargestellte Chromatogramm, welches unter Verwendung einer Anionenaustausch - HPLC - Säule aufgenommen wurde. Andere Oligonucleotidsynthesen, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, bestätigen diese Aussage.

In einem weiteren Versuch wurde Adamantanoylchlorid anstelle von Pivaloylchlorid als Kupplungsreagenz verwendet. Infolge sterischer Hinderung sollte die Bildung des entsprechenden Diacylphosphites **17** (Abschnitt 3, Abb. 10, 1-Adamantyl- statt *t*-Butyl-) nicht erfolgen. Wenn die Kupplungsreaktion auch bei Verwendung von N,N-Diethylanilin anstelle von Pyridin nur über die Bildung von Diacylphosphit **17** (Abschnitt 3, Abb. 10) verläuft, sollte bei Substitution des zuvor angewendeten Pivaloylchlorides durch Adamantanoylchlorid keine Kupplung erfolgen. Um zusätzliche sterische Effekte durch eine möglicherweise zu große Nähe zum festen Träger zu vermeiden, erfolgte ein entsprechender Versuch nicht direkt mit dem Startnucleosid am Träger. Unter Nutzung des Standard - H-Phosphonat - Verfahrens (in Pyridin/Acetonitril = 1/1) wurde ein 12-mer der Sequenz (T)<sub>12</sub> synthetisiert, das noch am Träger gebunden um die Sequenz (T)<sub>3</sub> nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsmittel in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel verlängert werden sollte (Abb. 66b).

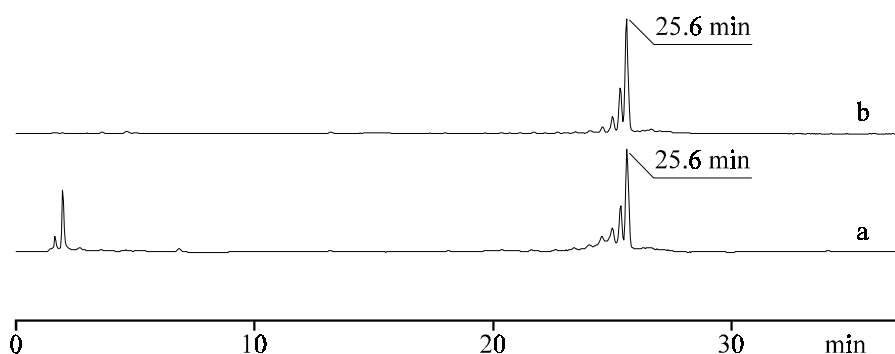


Abb. 66: HPL-Chromatogramme der Produkte a) der Synthese von (T)<sub>12</sub> nach Standard - H-Phosphonat - Verfahren sowie b) der Synthese von (T)<sub>15</sub> durch Verlängerung des nach dem Standard - H-Phosphonat - Verfahren hergestellten (T)<sub>12</sub> um (T)<sub>3</sub> nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsmittel in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub>

Vor dieser Verlängerung unter veränderten Bedingungen wurde ein kleiner Teil des synthetisierten 12-mers abgetrennt, oxidiert und mit konz. Ammoniaklösung entblockt (Abb. 66a). Der in Abb. 66a bei 25.6 Minuten erkennbare Substanzpeak kann (T)<sub>12</sub> zugeordnet werden. Der Vergleich mit dem in Abb. 66b dargestellten Chromatogramm zeigt deutlich, daß keine Verlängerung des unter Standardbedingungen synthetisierten 12-mers (T)<sub>12</sub> erfolgt ist. Das Syntheseprotokoll der Synthese der versuchten Verlängerung unter den veränderten Bedingungen zeigt jedoch für alle drei Kupplungsschritte Detritylierungswerte in der für eine erfolgreiche Kupplung erwarteten Größenordnung (Anlage 7).



Eine mögliche Erklärung hierfür sind schwache Wechselwirkungen, eine weitere Untersuchung dieser Beobachtung erfolgte jedoch nicht, da sich diese Bedingungen, wie die anderen Untersuchungen zeigen, als ungeeignet für die Synthese der Zielverbindungen erwiesen haben.

Bestätigt wird die Tatsache, daß keine Kettenverlängerung unter den Kupplungsbedingungen (Adamantanoylchlorid als Aktivierungsreagenz, N,N-Diethylanilin/Acetonitril = 1/1 als Lösungsmittel) erfolgt, durch die gelelektrophoretische Untersuchung dieser versuchten Synthese der Verlängerung von  $(T)_{12}$  um  $(T)_3$  zu  $(T)_{15}$  (Abb. 67).

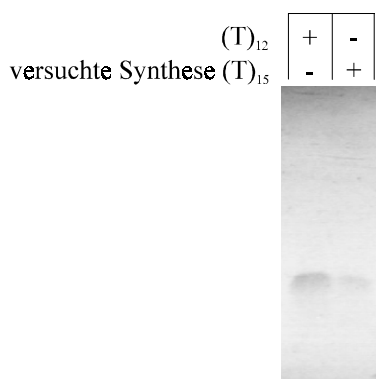


Abb. 67: 20% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der in Abb. 66a (Bahn 1) sowie der in Abb. 66b (Bahn 2) untersuchten Proben

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß N,N-Diethylanilin ebenso wie das zuvor untersuchte N-Methylmorpholin als Ersatz für Pyridin im Gemisch mit Acetonitril als Lösungsmittel für die Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren nicht geeignet ist. Die in der Literatur beschriebene schlechte Eignung von DMA als Base für das H-Phosphonat - Verfahren [40] konnten für die Verwendung von N,N-Diethylanilin bestätigt werden. Trotz einer deutlich längeren Kupplungsdauer von 20 Minuten pro Kupplungsschritt wurden keine ausreichenden Kupplungseffizienzen erzielt.

Die durchgeführten Untersuchungen mit N-Methylmorpholin und N,N-Diethylanilin machen deutlich, daß die Ersatzbase für Pyridin während der Oligonucleotidsynthese genügend nucleophil sein muß, die für die Kupplungsreaktion notwendige katalytische Wirksamkeit ausüben zu können, die notwendig ist, aufgrund einer schnellen Reaktion hohe Kupplungsausbeuten zu erzielen. Weiterhin darf die Koordination dieser Base am Platinatom nur schlecht erfolgen, um einen Austausch des Chloro- bzw. Bromoliganden gegen eben diese Base zu verhindern. Gemäß den in Abschnitt 7.1 (Abb. 60) dargestellten Untersuchungen sollten die Basen 2,6-Lutidin sowie 2,4,6-Collidin diesen Anforderungen gerecht werden.

## 7.4 Verwendung von 2,6-Lutidin und 2,4,6-Collidin als Basen im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren

Wie bereits am Ende des Abschnittes 7.3 erläutert, sollten Kupplungsprobleme, wie sie in den Abschnitten 7.2 und 7.3 beobachtet wurden, bei Verwendung von 2,6-Lutidin und 2,4,6-Collidin als Basen im Lösungsmittelgemisch für das H-Phosphonat - Verfahren nicht auftreten. Gleichzeitig ist der Austausch eines leicht austauschbaren Liganden gegen diese Basen bei Temperaturen unter 50°C nicht bzw. nur in sehr geringem Maße zu erwarten (Abschnitt 7.1, Abb. 60). Das Chromatogramm der Produkte eines zum Test synthetisierten 5-mers der Sequenz (T)<sub>5</sub> ist in Abb. 68 dargestellt.

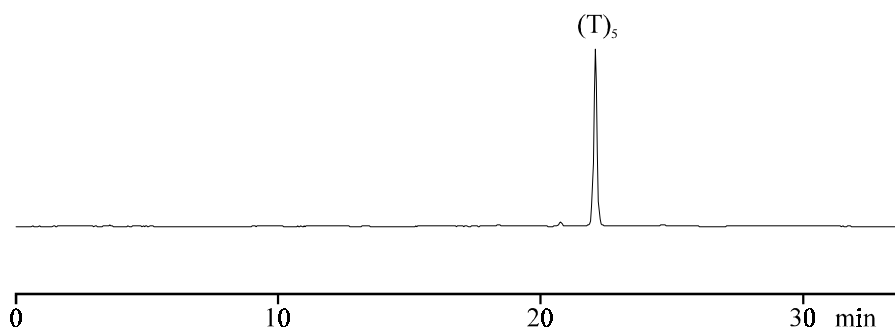


Abb. 68: HPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von (T)<sub>5</sub> nach dem H-Phosphonat - Verfahren in 2,4,6-Collidin/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub>

Erwartungsgemäß können die Standardmethoden ohne jede Modifizierung verwendet werden. Die Oxidation erfolgte mit einer Lösung von 2% Iod in 2,6-Lutidin/Wasser = 98/2. Da sich der plattinierte Synthesebaustein in dem polareren 2,6-Lutidin besser löst, wurde für das verwendete plattinierte H-Phosphonat stets 2,6-Lutidin verwendet. Zunächst wurde der eingesetzte plattinierte Synthesebaustein unmittelbar vor der Verwendung am Syntheseeautomaten mit Acetonitril codestilliert, um in geringen Mengen vorhandenes Wasser zu entfernen. Das Syntheseprotokoll der Oligonucleotidsynthese von d(CXCG) (X = Pt-T) zeigt für die Kupplung des plattinierten Thymidins nach Abschätzung aus der Detritylierung einen sehr großen Wert an (Anlage 8). Der Vergleich der nach Entblockung mit konz. Ammoniaklösung entstandenen Produkte vor und nach Behandlung mit Cyanidionen zeigte jedoch, daß der plattinierte Synthesebaustein nur in sehr geringem Maße oder gar nicht eingebaut wurde (Abb. 69).

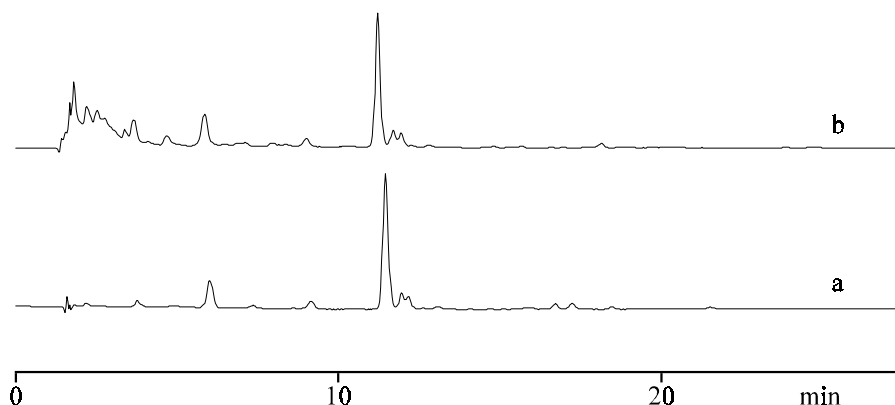


Abb. 69: HPL-Chromatogramme der Produkte der in Anlage 8 dargestellten Synthese von d(CXCG) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  a) vor sowie b) nach 24h Behandlung mit  $\text{CN}^-$  bei  $50^\circ\text{C}$

Obwohl die Retentionszeiten der Hauptprodukte in Abb. 69a und Abb. 69b etwas unterschiedlich sind, ist dennoch deutlich zu erkennen, daß nach Cyanidbehandlung kein neuer Substanzpeak entsteht, eine Deplatinierung folglich nicht beobachtet wird. Dies läßt sich durch zwei Möglichkeiten erklären. Entweder ist das entstandene Produkt sehr stabil und wird nur sehr schwer durch Cyanidionen deplatiniert, oder es wurde kein (platinirtes) Thymidin eingebaut. Dies wird durch die in gleicher Weise gelelektrophoretisch durchgeführten Untersuchung bestätigt.

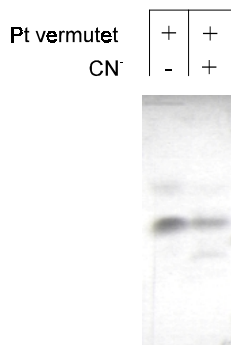


Abb. 70: 20% denaturierendes Polyacrylamid - Gel der Produkte der in Anlage 8 dargestellten Synthese vor (Bahn 1) und nach Behandlung mit  $\text{CN}^-$  (Bahn 2)

Die Annahme, daß als Hauptprodukt (CCG) entstanden ist, wird bestätigt durch die enzymatische Hydrolyse nach Isolieren der stärksten Bande aus dem in Abb. 70 (Bahn 1) dargestellten Gel (Abb. 71b). Alle größeren Substanzpeaks können den entstandenen unmodifizierten Nucleosiden zugeordnet werden. Zum Vergleich wurde d(CTCA) in gleicher Weise isoliert und enzymatisch verdaut (Abb. 71a).

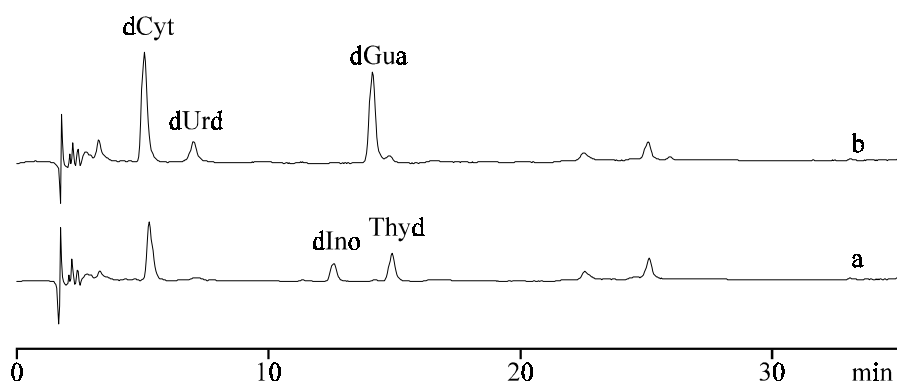


Abb. 71: HPL-Chromatogramme der nach Gelelektrophorese isolierten Oligonucleotide a) d(CTCA) und b) d(CCG) nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase

Das in Abb. 71a erkennbare 2'-Desoxyinosin entsteht durch Desaminierung von 2'-Desoxyadenosin, ebenso entsteht 2'-Desoxyuridin durch Desaminierung von 2'-Desoxycytosin. Die Bildung von 2'-Desoxyinosin aus 2'-Desoxyadenosin während der enzymatischen Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase ist bekannt [76]. Der bei 25 Minuten in beiden Chromatogrammen erkennbare Peak ist auf Rückstände der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese zurückzuführen, die trotz der Entsalzung mit Sephadex G-10 vor der enzymatischen Hydrolyse in geringer Menge vorhanden sind.

Als Ursache für die nicht erfolgte Kupplung des platinieren Nucleosides wurden Wechselwirkungen des Platins mit Donorgruppen über die Elektronenlücke des quadratisch planaren Platin(II)-komplexes mit 16 d-Elektronen vermutet, die senkrecht zur Komplexebene angeordnet ist. Deshalb haben Platin(II)-komplexe eine recht große Neigung, ein Solvensmolekül anzulagern. Weiterhin ist es denkbar, daß der Chloroligand gegen Donorgruppen austauscht und so die Kupplungsreaktion negativ beeinflusst. Es wurden daher zwei vergleichende Kupplungsversuche durchgeführt, wobei einmal der platinierter Synthesebaustein „Pt-T“ **29c** (Bromoisomer) analog der beschriebenen Synthese zweifach mit Acetonitril codestilliert wurde, im zweiten Fall erfolgte keine Codestillation, um das sich an dieser Stelle (vermutlich) befindliche Wassermolekül nicht zu entfernen. Sehr geringe Mengen Wasser stören bei der Kupplung nach dem H-Phosphonat - Verfahren nicht, da nach Reaktion des Acylphosphites **11** mit Wasser anstatt mit der Hydroxyverbindung **5** wieder das H-Phosphonat **15** gebildet wird (vgl. Abschnitt 3, Abb. 9), das nun erneut aktiviert werden kann. Lediglich das Aktivierungsreagenz wird dadurch verbraucht, ebenso wie bei der direkten Reaktion des Säurechlorides mit Wasser. In Anlage 9 und Anlage 10 sind die Syntheseprotokolle beider Kupplungsversuche dargestellt. In Analogie zu dem in Anlage 8 gezeigten Syntheseprotokoll ist im Falle der Verwendung des mit Acetonitril codestillierten platinieren Synthesebausteines wiederum ein sehr hoher Wert für die Detritylierung nach dem Kupplungsprozeß zu verzeichnen (Anlage 9). Erfolgte keine Codestillation, so ist der Wert

der Detritylierung immer noch höher als erwartet, jedoch deutlich geringer als im anderen Fall (Anlage 10).

Die Produkte beider Synthesen wurden nach Entblockung mit konz. Ammoniaklösung chromatographisch untersucht. Auch hier zeigt sich, daß fast keine Kupplung erfolgt, wenn das eingesetzte platinerte H-Phosphonat mit Acetonitril codestilliert wurde (Abb. 72a). Das Hauptprodukt ist Thymidin, das als Startnucleosid am Träger angebunden war. Im Gegensatz dazu erfolgt die Kupplung nahezu vollständig, wenn keine Codestillation des platinerten Synthesebausteines erfolgt (Abb. 72b).

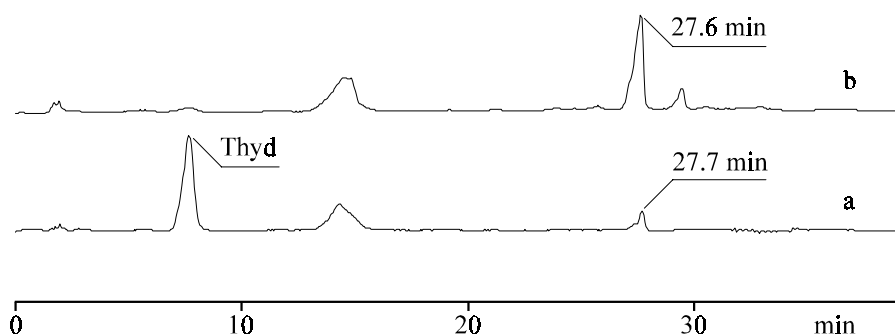


Abb. 72: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(XT) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ (**29c**) a) nach zweifacher Codestillation mit AN sowie b) ohne vorherige Codestillation nach dem H-Phosphonat - Verfahren in  $\text{LuT}/\text{AN} = 1/1$  als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$

Die Bildung eines *crosslinks* ist während der Synthese nicht zu erwarten, während der Behandlung mit konz. Ammoniaklösung ist der Austausch des Bromoliganden am Platin gegen  $\text{NH}_3$  anzunehmen. Es wird daher angenommen, daß der bei 27.7 bzw. 27.6 Minuten erkennbare Substanzpeak  $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_3\{(\text{T})_2\text{-N}^3\text{-T(2)}\}]^+$  entspricht.

In analoger Weise zu der Synthese, deren Produkte in Abb. 80 dargestellt sind, wurden nun zwei 4-mere der Sequenz d(TXTG) synthetisiert und mit konz.  $\text{NH}_3$  bzw. 0.15 M Natronlauge vom festen Träger abgespalten. Vor dem Entblocken wurden beide Oligonucleotide noch am Träger befindlich in 0.01 M Natriumacetat - Puffer mit einem pH-Wert von  $\text{pH} = 5$  für einen Tag bei  $50^\circ\text{C}$  behandelt. Unter diesen Bedingungen ist eine selektive Platinierung an  $\text{N}^7$  von Guanosin zu erwarten (vgl. Abschnitt 2). Die entstandenen Produkte sowie die mit  $\text{CN}^-$  behandelten Proben wurden chromatographisch untersucht (Abb. 73). Es ist erkennbar, daß das platinerte H-Phosphonat bei der Synthese, bei der mit konz.  $\text{NH}_3$  entblockt wurde, nahezu quantitativ gekuppelt hat, jedoch auch fast vollständig deplatinert wurde (Abb. 73a, vgl. Abb. 73b und Abb. 73e). Konzentrierte Ammoniaklösung (allein) deplatinert Thymidin nicht. Vielmehr ist zu vermuten, daß hier die bereits in Abschnitt 7.2 beobachteten unspezifischen Sekundärstruktureffekte auftreten und an der beobachteten Deplatinierung beteiligt sind, in Abschnitt 7 wird ihre Entstehung auch unter den hier angewandten Bedingungen gezeigt und

weiter behandelt. Einen Hinweis darauf stellt die nach Deplatinierung mit  $\text{CN}^-$  beobachtete Erhöhung des Produktpeaks von d(TTTG) dar (Abb. 73b, vgl. Abb. 73a).

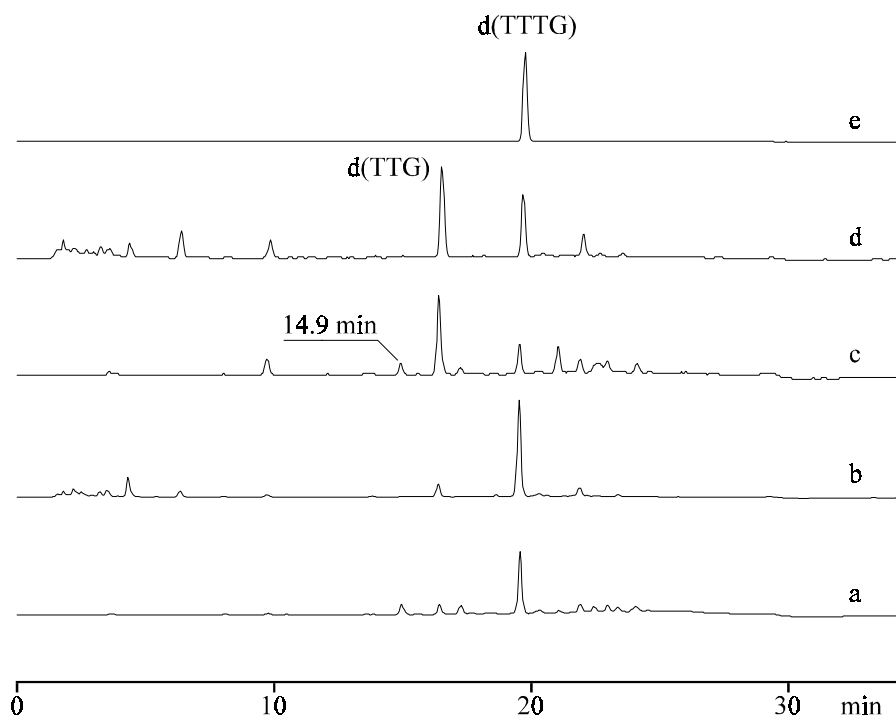


Abb. 73: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(TXTG) ( $X = \text{Pt-T}$ ) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ **29c** nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  a) vor und b) nach 24h Behandlung mit  $\text{CN}^-$  bei  $50^\circ\text{C}$ , nach Entblockung mit 0.15 M NaOH c) vor und d) nach 24h Behandlung mit  $\text{CN}^-$  bei  $50^\circ\text{C}$  sowie e) von d(TTTG)

Das Hauptprodukt der mit NaOH entblockten Produkte ist nach Rückschluß aus dem HPL-Chromatogramm nach enzymatischer Hydrolyse d(TTG), d.h. der platinierter Synthesebaustein wurde in der zweiten Synthese nicht quantitativ eingebaut (Abb. 73c und Abb. 73d, vgl. dagegen Abb. 73b). Dies ist erklärbar, da beide Oligonucleotidsynthesen direkt nacheinander durchgeführt wurden unter Nutzung der selben Lösungen, weiterhin ist vorher bereits festgestellt worden, daß der Austausch des in der Solvensposition des Platinkomplexes befindlichen Moleküls stark negativen Einfluß auf die Kupplungsfähigkeit des platinieren Synthesebausteines hat. Daher erscheint die deutlich längere Verweildauer dieses Synthesebausteines in Lut/AN = 1/1 bei Beginn dieser (der zweiten) Synthese die naheliegendste Erklärung zu sein. Eine weitere Feststellung ist, daß ein deutlich geringerer Teil deplatinierter 4-mer entstanden ist als bei der Synthese, bei welcher mit konz.  $\text{NH}_3$  entblockt wurde (Abb. 73a). Weitere Produktpeaks haben Retentionszeiten, die größer sind als die von d(TTTG) (Abb. 73c, vgl. Abb. 73e). Diese können *interstrand-crosslinks* zugeordnet werden, die durch die große räumliche Nähe der noch am Träger angebondenen Oligonucleotide während der Bildung dieser *crosslinks* nach dem in Abb. 73c dargestellten

Chromatogramm zu urteilen in deutlich größerer Menge entstehen, als dies bei der entsprechenden Reaktion in Lösung zu erwarten wäre. Nach Behandlung mit Cyanidionen sind diese Produktpeaks weitestgehend verschwunden, dafür ist eine deutlich größere Menge an d(TTTG) entstanden (Abb. 73d, vgl. Abb. 73c und Abb. 73e). Die entstandenen Produkte der Synthese des mit NaOH entblockten Oligonucleotides wurden mit Hilfe präparativer RP-HPLC isoliert und enzymatisch verdaut. Das in Abb. 73c bei 14.9 Minuten erkennbare Produkt blieb fast völlig unverdaut (Abb. 74a).

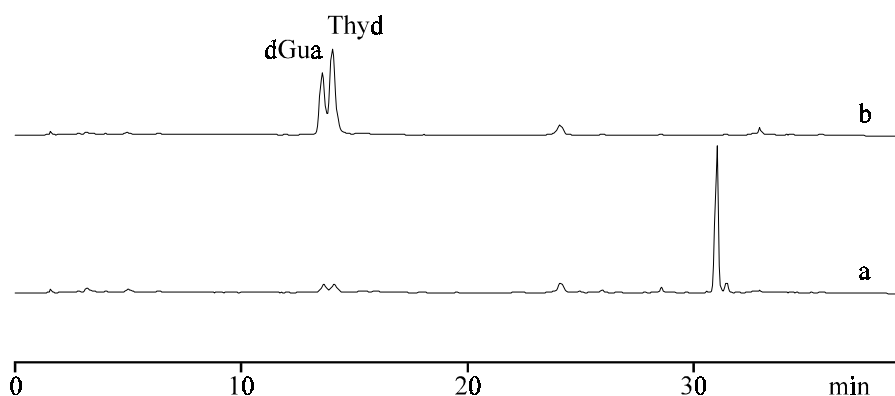


Abb. 74: HPL-Chromatogramme a) von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2\{d(TTTG)-N^3-T(2),N^7-G(4)\}]^+$  sowie b) von d(TTG) nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase

Dies ist ein deutlicher Hinweis sowohl für eine Platinierung an  $N^7$  von G(4) als auch an  $N^3$  von T(2). Eine Hinderung der Hydrolyse des Phosphorsäurediesters an der 5'-Position des platinieren Nucleosides durch das anwesende Platin wurde bereits in Abschnitt 6.3 beschrieben, dies erklärt die hier ebenfalls nicht zu beobachtende hydrolytische Spaltung der Phosphorsäurediesterbindung zwischen T(1) und T(2). Eindeutig zuzuordnen sind die Nucleoside 2'-Desoxyguanosin und Thymidin, ein sehr kleiner Substanzpeak ist auch bei der Retentionszeit erkennbar, bei welcher  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2N^7-G(N^3-T_{-H})]^+$  im Vergleichschromatogramm, das hier nicht abgebildet ist, erscheint. Dieser Substanzpeak ist jedoch zu klein, um daraus eine eindeutige Schlußfolgerung ziehen zu können. Das unter den angewandten Bedingungen fast völlig unverdauliche isolierte platinierter Oligonucleotid (Abb. 74a) wurde zur weiteren Charakterisierung mit Cyanidionen deplatiniert (Abb. 75b).

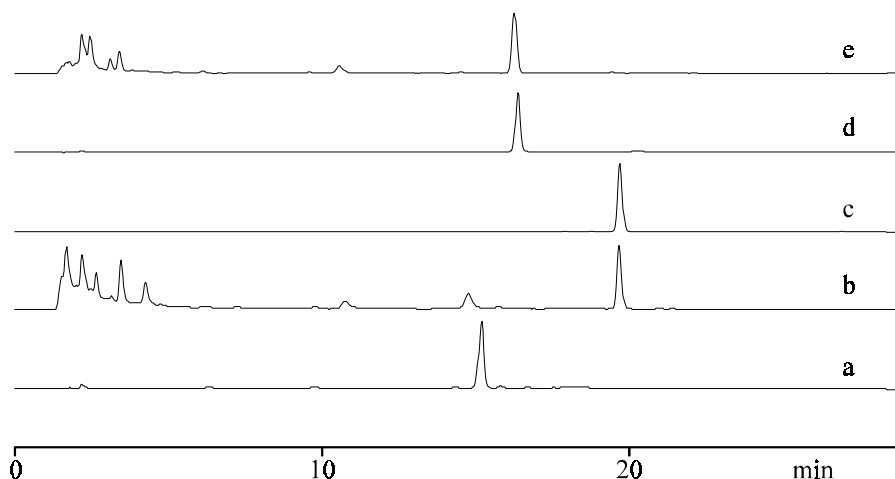


Abb. 75: HPL-Chromatogramme von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2\{d(TTTG)-N^3-T(2),N^7-G(4)\}]^+$  a) vor sowie b) nach 24h Behandlung mit  $CN^-$  bei  $50^\circ C$ , c) von  $d(TTTG)$ , des Hauptproduktes der in Abb. 73c dargestellten Produkte ( $d(TTG)$ ) d) vor sowie e) nach 24h Behandlung mit  $CN^-$  bei  $50^\circ C$

Abb. 75b zeigt, daß nach Deplatiniierung des betreffenden platiniierten Oligonucleotides eine Substanz entsteht, die in der HPLC identisch mit  $d(TTTG)$  eluiert. Die beiden gezeigten Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die gewünschte Zielverbindung (**Zielverbindung 2**, Abschnitt 4, Abb. 12),  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2\{d(TTTG)-N^3-T(2),N^7-G(4)\}]^+$ , isoliert wurde (Abb. 76).

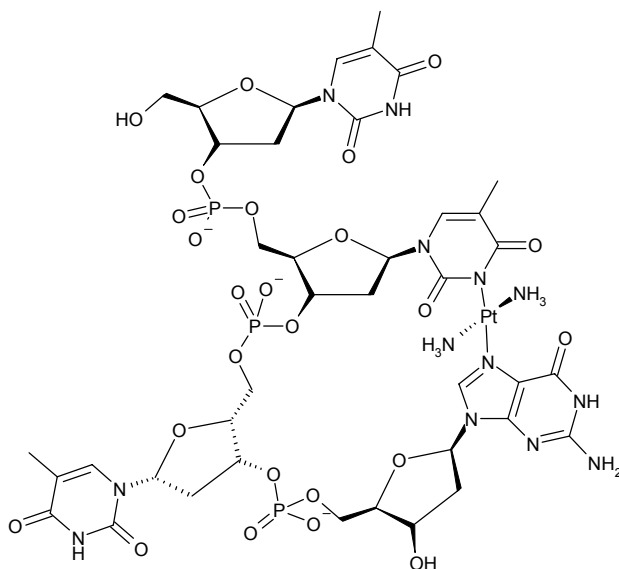


Abb. 76: Strukturformel von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2\{d(TTTG)-N^3-T(2),N^7-G(4)\}]^+$

Die theoretische Molmasse dieses platiniierten Oligonucleotides mit *intrastrand-crosslink* ist  $m/z = 1408.0$ , gefunden wurde eine Molmasse von  $m/z = 1410.6$ . Die vermutete Zuordnung wird damit bestätigt. Weiterhin ist das Hauptprodukt der in Abb. 73c dargestellten Synthese,  $d(TTG)$ , vor und nach Behandlung mit Cyanidionen in Abb. 75d bzw. Abb. 75e dargestellt. Nach Cyanidbehandlung ist kein Unterschied zum Chromatogramm ohne Cyanidbehandlung



zu erkennen, dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß hier kein Platin anwesend ist. Bestätigt wird dies durch Zuordnung der entstandenen Produkte nach enzymatischer Hydrolyse (Abb. 74b).

Für die Synthese eines längeren platiniierten Oligonucleotides wurde versucht, analog der bei *Manchanda et al.* beschriebenen Prozedur [57] in drei Schritten zu arbeiten. Die Oligonucleotidsynthese des 10-mers der Sequenz d(TGTACCAGCT) erfolgte unter Anwendung des Amidit - Verfahrens. Ein geringer Teil wurde mit konz. Ammoniaklösung entblockt (Abb. 77a). Das noch am Träger gebundene und vollständig geschützte 10-mer wurde dann unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei der erfolgreichen Synthese des platiniierten 2-mers sowie des platiniierten 4-mers angewendet wurden, nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel um die Länge einer Base mit dem Bromoisomer des platiniierten Synthesebausteins „Pt-T“ **29c** verlängert. Nach Oxidation, die auch hier wieder mit einer Lösung von 2% Iod in 2,6-Lutidin/Wasser = 98/2 erfolgte, wurde das noch am Träger gebundene Oligonucleotid 24 Stunden bei 50°C mit einer gesättigten Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) behandelt. So sollte die Austauschbarkeit der Position in *trans* - Stellung zum Thymidin am Platin bei dieser Verfahrensweise prinzipiell gezeigt werden. Dabei wäre im Gegensatz zur Bildung von *crosslinks* bei einer Behandlung ohne 2'-Desoxyguanosin unter sonst gleichen Bedingungen ein (in Bezug auf das Platin) nahezu einheitliches Produkt zu erwarten. Im Anschluß daran wurden zwei kleine Proben abgetrennt und mit konz. Ammoniaklösung bzw. 0.15 M Natronlauge vom Träger abgespalten und entschützt (Abb. 77b und Abb. 77c).

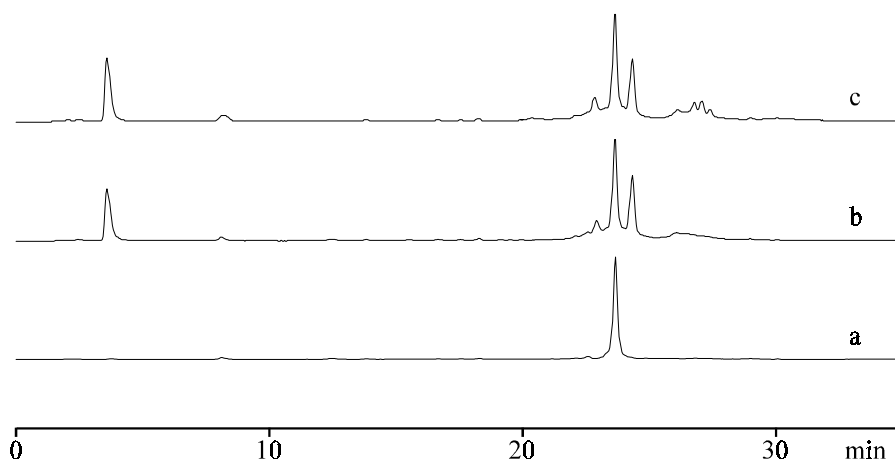


Abb. 77: HPL-Chromatogramme a) von d(TGTACCAGCT) sowie der Produkte der Synthese von d(XTGTACCAGCT) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel nach 24 Behandlung mit einer gesättigten wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) nach Entblockung b) mit konz.  $\text{NH}_3$  bzw. c) mit 0.15 M NaOH

Es zeigt sich ein übereinstimmendes Ergebnis, neben dem zuvor synthetisierten 10-mer ist ein neues Produkt entstanden. Die nur unvollständige Kupplung des platiniierten Nucleosides kann

auch hier teilweise auf Austauschprozesse des in der Solvensposition am Platin befindlichen Moleküls gegen Acetonitril zurückgeführt werden (vgl. Abb. 73c). Andererseits lag die Zeitdauer für mögliche Austauschprozesse in dem Bereich, in welchem eine Auswirkung auf die Kupplungseffizienz bisher nicht beobachtet wurde (Abb. 72b und Abb. 73a bzw. Abb. 73b). Dies weist darauf hin, daß die Gegenwart einer anderen Substanz, die viel schneller das senkrecht zur Komplexebene des Platins gebundene Solvensmolekül bzw. den Bromoliganden austauscht als Acetonitril, zugegen ist und einen vergleichbaren Effekt auslöst wie der, welcher nach Codestillation des platinieren Monomeren „Pt-T“ (**29c**) mit Acetonitril vor der Oligonucleotidsynthese beobachtet wurde (vgl. Abb. 72a). Es erscheint sehr wahrscheinlich, daß es sich hierbei um 1H-Tetrazol handelt, das als Aktivierungsreagenz während der zuvor durchgeführten Oligonucleotidsynthese nach dem Phosphoramidit - Verfahren in großen Mengen eingesetzt wurde (vgl. Abschnitt 3, Abb. 11).

Die Substanzpeaks bei 23.6 und 24.3 Minuten wurden mit Hilfe präparativer RP-HPLC isoliert und nachfolgend charakterisiert. Für das abgetrennte 10-mer d(TGTACCAGCT) beträgt die theoretisch zu erwartende Molmasse  $m/z = 3004.0$ , mit Hilfe von MALDI-MS konnte eine Molmasse von  $m/z = 3000.4$  ermittelt werden. Erwartungsgemäß wird die vermutete Molmasse bestätigt. Für das entstandene Produkt konnte eine Molmasse von  $m/z = 3309.8$  ermittelt werden. Dies entspricht dem unmodifizierten 11-mer d(TTGTACCAGCT), das eine (theoretische) Molmasse von  $m/z = 3308.2$  hat.

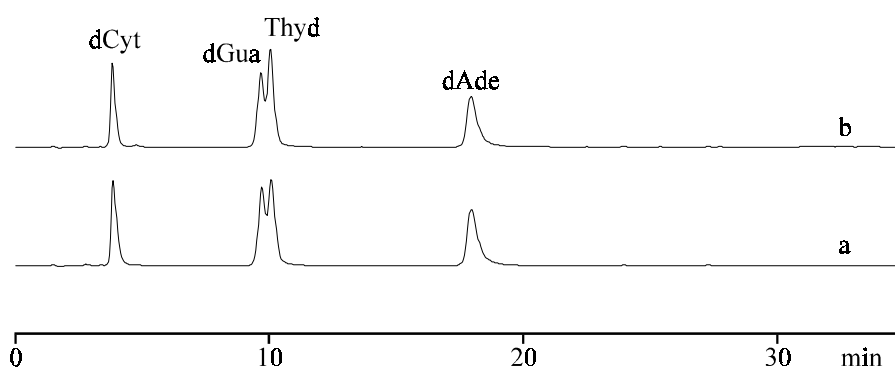


Abb. 78: HPL-Chromatogramme a) von d(TGTACCAGCT) sowie b) von d(TTGTACCAGCT) nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase

Folglich wurde das platinierter Nucleosid in gewünschter Weise angekuppelt (wenn auch nur unvollständig), während der Folgeprozesse jedoch deplatinierter. Dies wird bestätigt durch die nach enzymatischer Hydrolyse aufgenommenen Chromatogramme Abb. 78a und Abb. 78b. In dem in Abb. 78b dargestellten Chromatogramm ist deutlich die etwas größere Menge an entstandenem Thymidin gegenüber dem des enzymatisch hydrolysierten 10-mers (Abb. 78a) erkennbar. Eine Deplatinierung des Thymidins durch die Behandlung mit einer gesättigten wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) ist sehr unwahrscheinlich, unter gleichen Bedingungen wurde 3'-trägergebundenes platinierter

Thymidin umgesetzt, eine Deplatinierung wurde dabei nicht festgestellt (Abschnitt 7, Abb. 90a und Abb. 90b). Eine mögliche Erklärung ist, daß das während der Oligonucleotidsynthese des 10-mers nach dem Amidit - Verfahren zur Kupplung eingesetzte 1H-Tetrazol nicht vollständig entfernt war. Durch Koordination des Tetrazols am Platin ist eine Deplatinierung des sich in *trans* - Stellung am Platin befindlichen Thymidins während der Behandlung in Acetat - Puffer bei einem pH - Wert von 5 bei 50°C für 24 Stunden denkbar. Andererseits muß hier festgestellt werden, daß eine teilweise Deplatinierung bereits vorher beobachtet wurde (Abb. 73a und Abb. 73c), 1H-Tetrazol war dort nicht zugegen. Die Reaktion von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] mit 1H-Tetrazol in Wasser für 45 Minuten bei 50°C führte nicht zu einer erkennbaren Menge an deplatinerten Thymidin, der teilweise Austausch des Chloroliganden kann jedoch beobachtet werden (Abb. 79b). Nach 45 Minuten Reaktion bei 90°C zeigt sich jedoch eine deutliche Menge Thymidin (Abb. 79c).

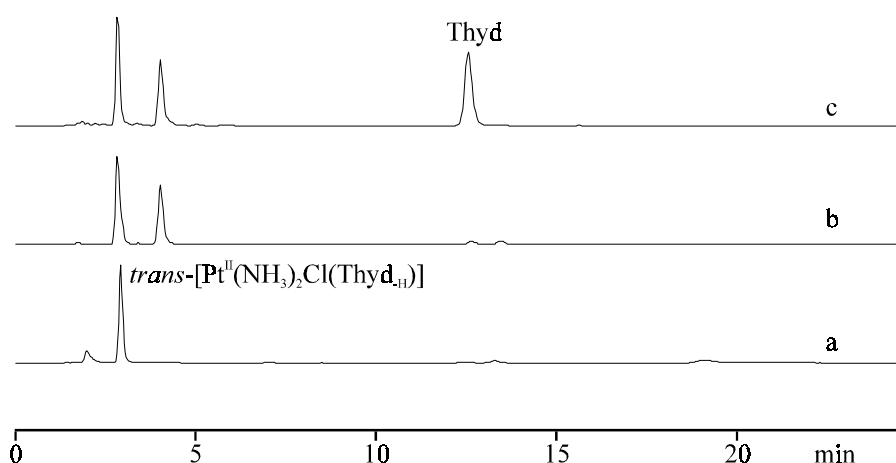


Abb. 79: HPL-Chromatogramme a) von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] sowie der Produkte der Reaktion von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] mit 1H-Tetrazol in Wasser für 45 Minuten b) bei 50°C und c) bei 90°C

Eine genaue Erklärung für die beobachtete vollständige Deplatinierung kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht gegeben werden. Diese Synthese wurde noch zwei weitere Male durchgeführt, dabei zeigte sich überhaupt keine bzw. nur eine sehr geringe Kupplung des platinieren Nucleosides nach Schlußfolgerung aus HPL-Chromatogrammen. Dies bekräftigt die bereits getroffene Vermutung, daß die Kombination der Synthese eines nach dem Amidit - Verfahren synthetisierten Oligonucleotides und der Fortsetzung der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren unter den angewandten Bedingungen nicht sinnvoll ist. Die Durchführung der gesamten Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren konnte leider nicht mehr durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es möglich ist, mit Hilfe des H-Phosphonat - Verfahrens in 2,6-Lutidin/Acetonitril als Lösungsmittelgemisch den platinieren Synthesebaustein „Pt-T“ (**29c**) erfolgreich in ein Oligonucleotid einzubauen. Dabei bleibt die Austauschbarkeit der Position in *trans* - Stellung zum Thymidin am Platin erhalten. Dies

wurde durch die gezielte Synthese eines Oligonucleotides mit *intrastrand-crosslink* gezeigt. So konnte  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2\{d(TTTG)-N^3-T(2),N^7-G(4)\}]^+$  synthetisiert, isoliert und charakterisiert werden. Die Produktausbeute ist jedoch verhältnismäßig gering, dies ist hauptsächlich auf die Ausbildung verschiedener (unerwünschter) *interstrand-crosslinks* zurückzuführen. Die Ausbildung von *interstrand-crosslinks* sollte sich durch die Verwendung eines Trägers mit geringerer Beladung an Startnucleosid für die Oligonucleotidsynthese verringern lassen. Ein weiterer Aspekt ist die in gewissem Ausmaß auftretende Deplatinierung, deren Ursache nicht klar ist. Die Kombination der Oligonucleotidsynthese nach dem Amidit - Verfahren für den unmodifizierten Teil des zu synthetisierenden Oligonucleotides mit der nach dem H-Phosphonat - Verfahren für die Kupplung des platiniierten Nucleosides analog *Manchanda et al.* [57] konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Erste Hinweise lassen auf störende Nebenreaktionen während der Kupplung schließen. Die Synthese eines längeren platiniierten Oligonucleotides unter ausschließlicher Anwendung des H-Phosphonat - Verfahrens konnte nicht mehr durchgeführt werden.

## 8 Immobilisierung von platinierter Thymidin zur Synthese platinierter Oligonucleotide

Bei Verwendung eines kupplungsfähigen platinierter Nucleosides ist der Einbau an jeder Position denkbar mit Ausnahme der Position am 3'-Ende eines Oligonucleotides. Dies kann realisiert werden durch die Anbindung des platinierter Nucleosides an einen festen Träger wie z.B. CPG. Da sich am Startnucleosid für die Synthese eines Oligonucleotides keine kupplungsfähige Phosphorgruppierung befindet, ist die Verwendbarkeit eines trägergebundenen platinierter Nucleosides für die Synthese eines platinmodifizierten Oligonucleotides prinzipiell unabhängig des verwendeten Verfahrens für die Oligonucleotidsynthese gegeben. Dies wurde von *Schürer et al.* (Abb. 80) realisiert [77].

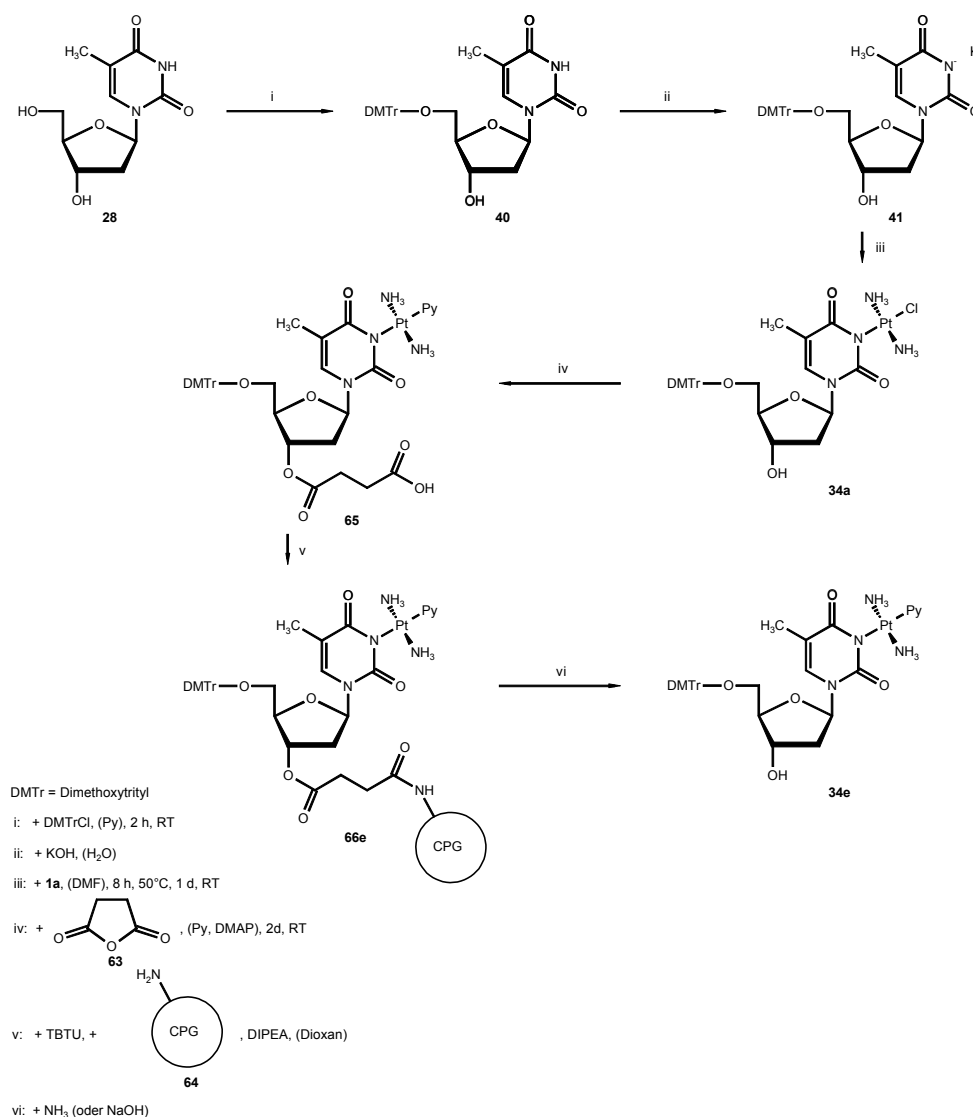


Abb. 80: Schema der Immobilisierung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thy<sub>H</sub>)] (**34e**) durch *Schürer et al.* [77]

Bis zur Synthesestufe des *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) erfolgte die Synthese analog der Beschreibung in Kapitel 5.1. Die Succinylierung erfolgte nach der Prozedur von *Atkinson et al.* [55] in Pyridin. Pyridin bleibt in der Koordinationssphäre des Platins, wie noch gezeigt werden wird. Bei Behandlung des von *Schürer et al.* [77] (vgl. Abb. 80) synthetisierten trägergebundenen Thymidylatkomplexes **66e** mit Wasser wird eine Substanz vom Träger abgespalten (Abb. 81c).

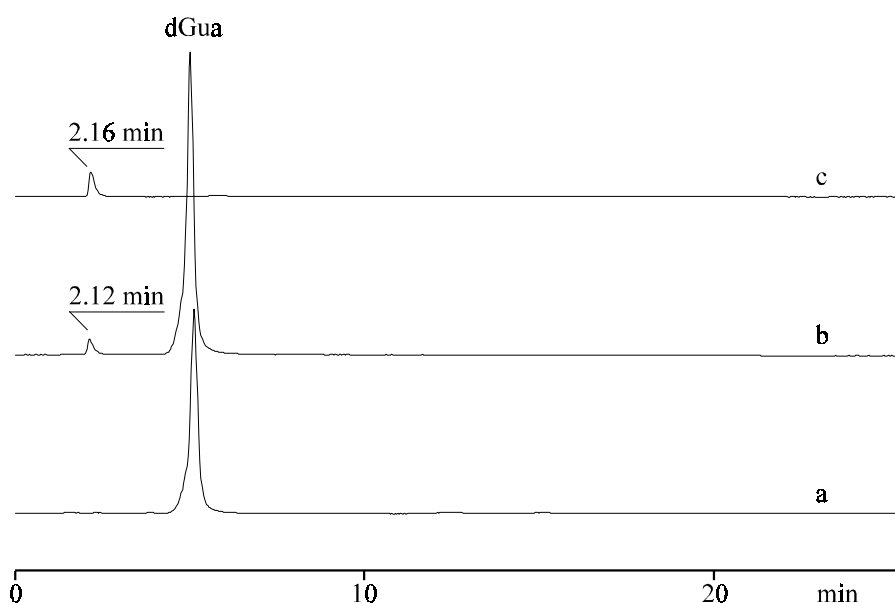


Abb. 81: HPL-Chromatogramme der wäßrigen Lösungen von 2'-Desoxyguanosin nach Behandlung mit immobilisiertem platinierter Thymidin a) synthetisiert entsprechend Abb. 85 nach 7 d bei RT, b) synthetisiert von *Schürer et al.* [77] entsprechend Abb. 80 nach 6 d bei RT, c) HPL-Chromatogramm von Wasser nach Behandlung mit immobilisiertem platinierter Thymidin, synthetisiert von *Schürer et al.* [77] entsprechend Abb. 80 nach 6 d bei RT

Diese Substanzabspaltung erfolgt auch in wäßriger 2'-Desoxyguanosin - Lösung, wie aus Abb. 81b ersichtlich ist. Wenn die Succinylierung in Dioxan unter Zusatz von Triethylamin als Base erfolgt (Abb. 85), wird dieser Effekt nicht beobachtet (Abb. 81a). Bei dieser Substanz könnte es sich sowohl um das platinierter Nucleosid-3'-succinoylat **66e** (Abb. 80) als auch um die entsprechende 3'-deacylierte Verbindung **34e** handeln, dabei ist es zu vermuten, daß eine *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> - Koordinationssphäre vorliegt. Wahrscheinlich ist die Koordination der Carboxylat - Gruppe von **65** am Platin im Austausch gegen den Chloroliganden in geringem Umfang während der Succinylierung, wobei anzunehmen ist, daß der Chloroligand hauptsächlich gegen Pyridin ausgetauscht wird. Dies würde die in Abb. 81b und Abb. 81c beobachtete Hydrolyse erklären. Eine genaue Aussage über die Struktur dieser Verbindung kann aufgrund der wenigen durchgeführten Untersuchungen nicht gemacht werden.

### **Synthese von Oligonucleotiden mit immobilisiertem $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py(Thyd-H)]^+$ (**66e**)**

Dieses trägergebundene platinierte Thymidin (**66e**) wurde als Startnucleosid für Oligonucleotidsynthesen verwendet. Aus Tabelle 4 geht deutlich hervor, daß sich Pyridin bereits vor der Oligonucleotidsynthese in der Platinkoordinationssphäre befindet.

Tabelle 4: Oligonucleotidsynthesen mit dem von Schürer *et al.* [77] (vgl. Abb. 80) synthetisierten trägergebundenen platinierten Thymidin (**66e**)

Produkt	Molmasse [m/z]		Produktmenge	
	theoretisch	gefunden	Rohsynthese	isoliert
$trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py\{d(AT)-N^3-T(2)\}]^+$	862.7	862.1	2.8 OD <sup>13</sup>	-
$trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py\{d(CT)-N^3-T(2)\}]^+$	838.6	837.9	3.1 OD <sup>13</sup>	-
$trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py\{d(CTTGTACCAGCT)-N^3-T(12)\}]^+$	3903.6	3903.4	15.2 OD <sup>14</sup>	3.5 OD <sup>15</sup>
$trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py\{d(CTTGTACCAGCT)-N^3-T(12)\}]^+$	3903.6	3902.8	18.0 OD <sup>16</sup>	-

Beide 12-mere wurden mit dem Amidit - Verfahren hergestellt, Pyridin tritt während der gesamten Oligonucleotidsynthese nicht auf. Die  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2PyT-H]^+$  - Spezies entsteht sowohl bei Entblockung mit konz. Ammoniaklösung als auch bei Anwendung von Natronlauge. Aus Abb. 82 ist ersichtlich, daß das von Schürer *et al.* [77] (vgl. Abb. 80) synthetisierte trägergebundene platinierte Thymidin (**66e**) geeignet ist, mit relativ guten Ausbeuten am 3'-Ende  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2PyT-H]^+$  - modifizierte Oligonucleotide zu synthetisieren.

<sup>13</sup> synthetisiert mit dem H-Phosphonat - Verfahren, Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub>

<sup>14</sup> synthetisiert mit dem Amidit - Verfahren, Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub>

<sup>15</sup> entsprechen 15 % Ausbeute

<sup>16</sup> synthetisiert mit dem Amidit - Verfahren, Entblockung mit 0.18 M NaOH

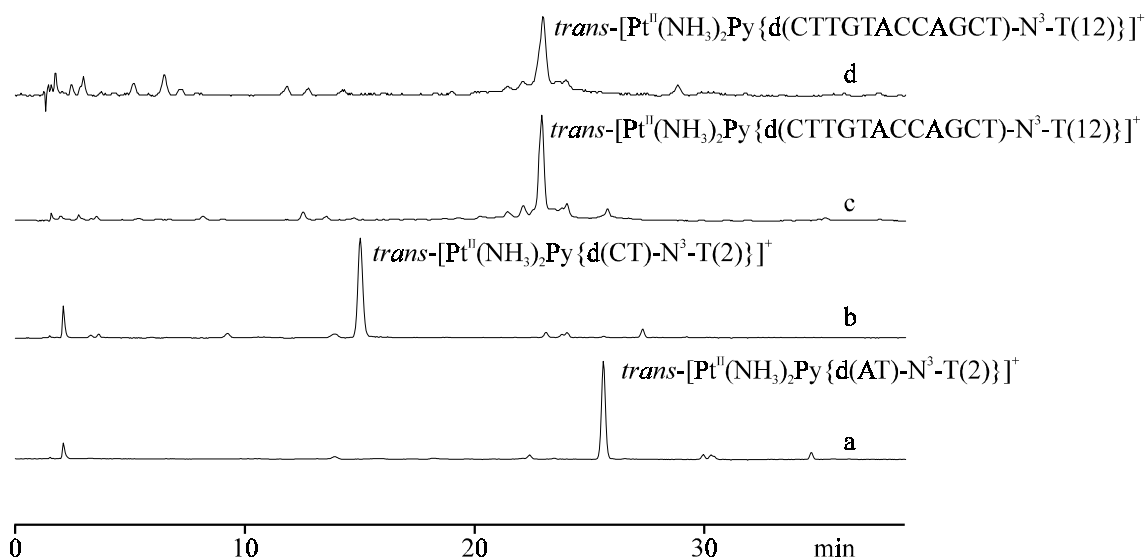


Abb. 82: HPL-Chromatogramme der Lösungen von Oligonucleotidsynthesen unter Verwendung des von Schürer *et al.* [77] (vgl. Abb. 80) immobilisierten platinisierten Thymidins (**66e**) nach Entblockung a) von d(AX), b) von d(CX) und c) von d(CTTGTACCAGCX) (X = Pt-T) mit konz.  $\text{NH}_3$  sowie d) von d(CTTGTACCAGCX) (X = Pt-T) mit 0.18 M NaOH

Da die in Abb. 82a bis Abb. 82c dargestellten Lösungen bereits in hohem Anteil die Produkte enthalten, wurden Proben dieser Lösungen direkt enzymatisch hydrolysiert. In Abb. 83a ist das HPL - Chromatogramm der in Abb. 82c dargestellten Probe nach enzymatischer Hydrolyse dargestellt. Der Substanzpeak bei 2.04 min kann dem in Abb. 83b bei 2.02 min auftretenden  $\text{trans-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py(Thyd}_\text{H})]^+$  zugeordnet werden, wie der Vergleich mit dem in Abb. 83b dargestellten Chromatogramm zeigt. Obwohl hier kein direkter Vergleich des platinmodifizierten 2-mers  $\text{trans-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py}\{\text{d(CT)-N}^3\text{-T(2)}\}]^+$  vorhanden ist, kann der bei 13.6 min zu beobachtende Substanzpeak diesem platinisierten 2-mer zugeordnet werden (vgl. Abb. 84b sowie Abb. 41d und Abb. 41e).

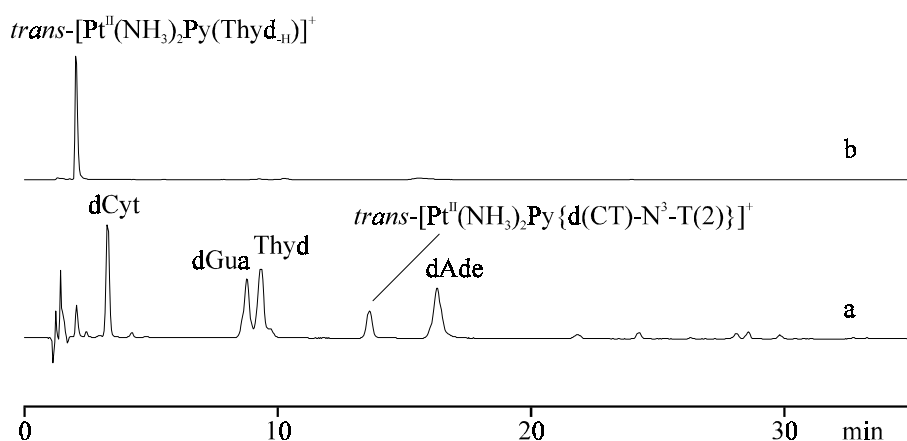


Abb. 83: HPL - Chromatogramm a) der in Abb. 82c dargestellten Probe nach enzymatischer Hydrolyse sowie b) von  $\text{trans-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py(Thyd}_\text{H})]^+$

Dieses platinisierte 2-mer ist der deutlichste Hinweis auf eine Ankupplung des von 3' nach 5' gelesen nachfolgenden Nucleosides an die 5'-Hydroxyfunktion des platinmodifizierten



trägergebundenen Thymidins (**66e**). Die in Abb. 84a und Abb. 84b dargestellten Chromatogramme der in Abb. 82a bzw. Abb. 82b dargestellten Proben nach enzymatischer Hydrolyse bestätigen die bisher stets beobachtete verlangsamte enzymatische Hydrolyse der 5'-Phosphorsäurediesterbindung des platinmodifizierten Thymidins bei Verwendung von Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase.

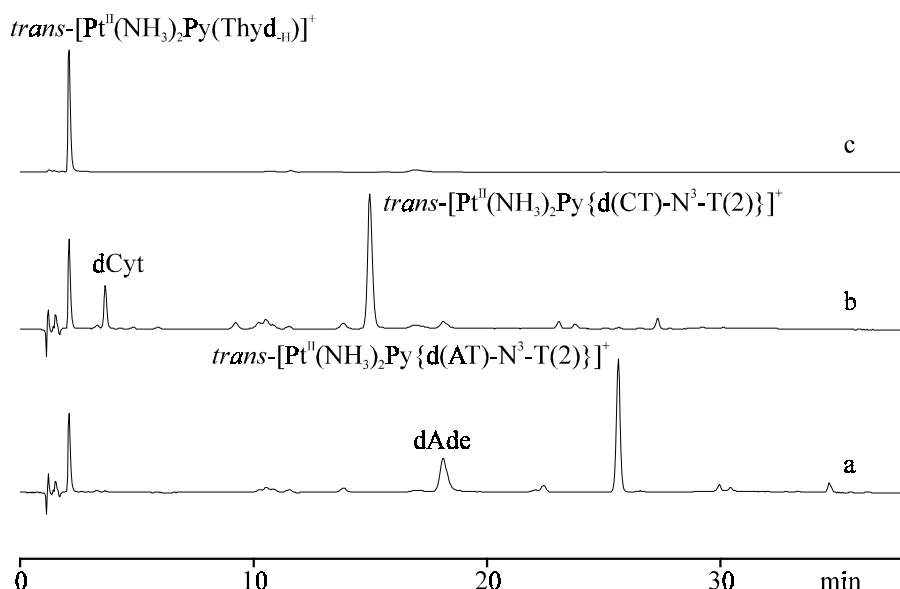


Abb. 84: HPL - Chromatogramme a) der in Abb. 82a und b) der in Abb. 82b dargestellten Probe nach enzymatischer Hydrolyse sowie c) von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2PyT_{-H}]^+$

Hier erscheint  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py(Thyd_{-H})]^+$  bei 2.08 min (Abb. 84a) bzw. bei 2.07 min (Abb. 84b und Abb. 84c). Die weitestgehend unverdauten platiniierten 2-mere  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py\{d(AT)-N^3-T(2)\}]^+$  und  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Py\{d(CT)-N^3-T(2)\}]^+$  haben hier Retentionszeiten von 25.6 min bzw. 15.0 min.

### ***Immobilisierung von platinisiertem Thymidin unter Erhaltung der Austauschbarkeit der trans - Position zum Thymidin am Platinatom***

Alle Oligonucleotidsynthesen, die mit dem nach Abb. 80 synthetisierten trägergebundenen platiniierten Thymidin (**66e**) durchgeführt wurden, führen jedoch zur Entstehung der  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2PyT_{-H}]^+$  - Spezies, das am Platin koordinierte Pyridin stellt keine Abgangsgruppe dar. Daher wurde der in Abb. 80 dargestellte Syntheseweg in dem Syntheseschritt der Succinoylierung modifiziert (Abb. 85). Nach zweimaliger Codestillation von  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(O^{5'}-DMTr-Thyd_{-H})]$  (**34a**) mit trockenem Dioxan unter Zusatz von 0.4 % Triethylamin wurden 0.9 eq Bernsteinsäureanhydrid (**63**) zur Dioxanlösung zugegeben. Im Zeitraum von sieben Tagen erfolgte die schrittweise Zugabe von 12 eq Triethylamin. Diese Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Methanol = 9/1 an Kieselgel

verfolgt. *Trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) erscheint auf dem DC bei dem R<sub>f</sub> - Wert von 0.23, das entstehende Produkt wird bei R<sub>f</sub> = 0.04 beobachtet und kann dem gewünschten 3'-succinoylierten Produkt **65a** (Abb. 85) zugeordnet werden. Eine intramolekulare Austauschreaktion der entstehenden Carboxylatgruppe gegen den Chloroliganden am Platin erscheint aus geometrischen Gründen nicht möglich, wohl aber eine intermolekulare Reaktion. Da sowohl das Chloridanion als auch das Carboxylatanion mit mittlerer Bindungsstärke am Platin koordinieren (vgl. Abschnitt 2), ist diese Reaktion zu einem gewissen Anteil auch zu erwarten. Tatsächlich beobachtet man ein zweites Produkt, das auf dem DC gegenüber dem Hauptprodukt als deutlich schwächerer Substanzfleck bei R<sub>f</sub> = 0.01 sichtbar ist. Dieser Substanzfleck kann dem Produkt einer solchen intermolekulare Reaktion zugeordnet werden.

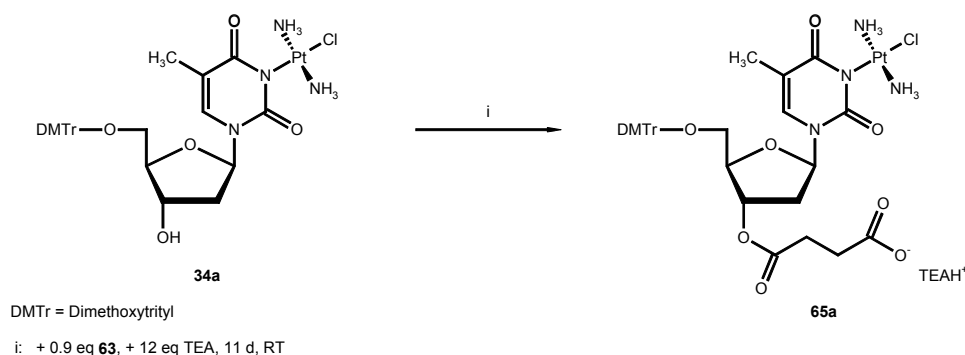


Abb. 85: Reaktionsschema der 3'-Succinylierung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)]

Das so synthetisierte Succinoylat **65a** wurde einrotiert und ohne Reinigung für die nachfolgende Kupplungsreaktion verwendet. Die Anbindung an LCAA-CPG (**64**) erfolgte analog dem entsprechenden Reaktionsschritt in Abb. 80 mit TBTU und Triethylamin in Dioxan. Das bei der Succinylierung unumgesetzte *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) stört dabei nicht, da der Aktivester bevorzugt mit der Aminogruppe des LCAA-CPG (**64**) reagiert. Theoretisch denkbar ist die Ankupplung des bei der Succinylierung besprochenen entstehenden Nebenproduktes. Es ist jedoch zu vermuten, daß dieses Nebenprodukt deutlich schlechter löslich ist und deshalb - wenn überhaupt - nur in sehr geringen Mengen angekuppelt wird.

Da bei dem von *Schürer et al.* [77] (vgl. Abb. 80) immobilisierten platinierter Thymidin (**66e**) bereits bei Einwirkung von Wasser ein geringer Teil des platinierter Thymidins bzw. -succinoylates abgespalten wird, wurde das hier beschriebene trägergebundene platinierter Thymidin (**66a**) mit Wasser versetzt und eine mögliche Reaktion UV - spektroskopisch verfolgt (Abb. 86). Der Aufbau einer Absorption bei 260 nm mit der Zeit ist hier im Gegensatz zu dem von *Schürer et al.* [77] (vgl. Abb. 80) immobilisierten platinierter Thymidin (**66e**) nicht zu beobachten. Ist der Chloroligand am Platin teilweise durch Carboxylat ersetzt, wäre zu erwarten, daß es in Wasser zu einem teilweise stattfindenden

Austausch des Carboxylatoliganden kommt. Dies sollte durch die Zunahme der Absorption bei 260 nm zu erkennen sein, die jedoch nicht beobachtet wird. Es bestätigt sich daher die bereits getroffene Annahme, daß der Anteil der immobilisierten Carboxylatoplatinspezies sehr gering ist oder die Ankupplung dieser Platinspezies gar nicht erfolgt ist. Diese Reaktion erscheint, wie bereits gesagt wurde, als die wahrscheinlichste Erklärung der beobachteten Substanzabspaltung in wäßriger Lösung bei dem von *Schürer et al.* [77] (vgl. Abb. 80) synthetisierten trägergebundenen platinieren Thymidin (**66e**).

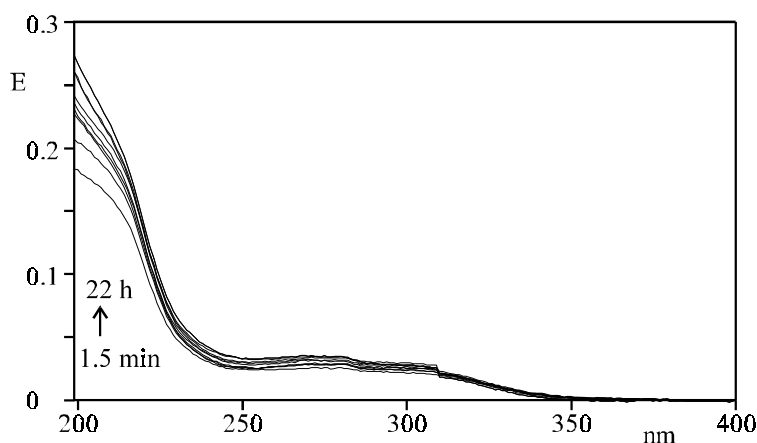


Abb. 86: UV - Spektren der Behandlung des 3'-trägergebundenen *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) mit Wasser nach 1.5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h und 22 h

Eine Bestätigung dafür, daß hier keine Substanzabspaltung in wäßriger Lösung erfolgt, ist die analog durchgeführte Behandlung des beladenen Trägers mit einer Lösung von 2'-Desoxyguanosin (Abb. 87).

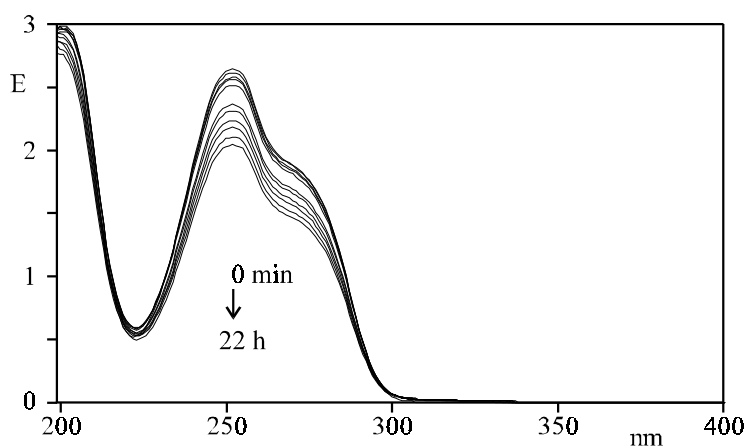


Abb. 87: UV - Spektren der Reaktion des 3'-trägergebundenen *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) mit 2'-Desoxyguanosin in Wasser nach 0 min, 1.5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h und 22 h

Erkennbar ist eine deutliche Abnahme der Extinktion mit der Zeit. Die Lösung der in Abb. 87 dargestellten UV - spektroskopisch verfolgten Reaktion wurde nach sieben Tagen HPL-chromatographisch untersucht (Abb. 81a). Neben 2'-Desoxyguanosin konnte keine weitere

Substanz beobachtet werden. Als Blindversuch erfolgte eine analog durchgeführte UV - spektroskopische Verfolgung der Behandlung des unbeladenen LCAA-CPG - Trägers (**64**) mit 2'-Desoxyguanosin in Wasser (Abb. 88). Dabei ist gleichfalls eine Abnahme zu beobachten, diese ist jedoch deutlich geringer verglichen mit der bei Verwendung des mit dem Chloroplatinkomplex beladenen Trägers **66a**. Es wird angenommen, daß es sich hier um eine Adsorption von 2'-Desoxyguanosin an CPG handelt. Die Abnahme der Extinktion bei 252 nm ist von beiden Messungen in Abb. 89 vergleichend dargestellt.

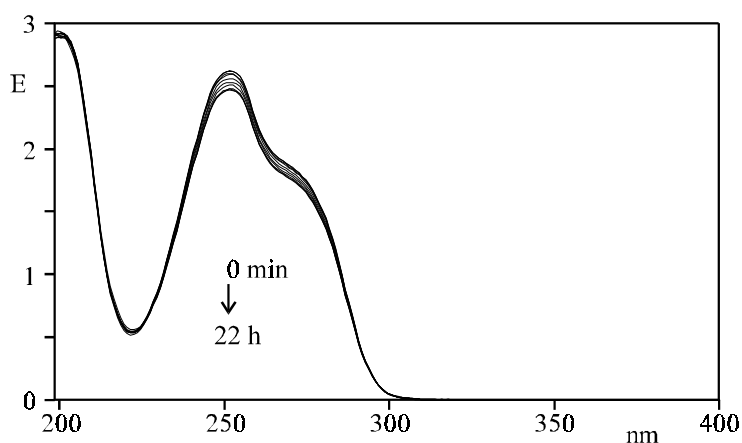


Abb. 88: UV - Spektren der Behandlung des unbeladenen LCAA-CPG (**64**) mit 2'-Desoxyguanosin in Wasser nach 0 min, 1.5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 22 h

Während die Meßwerte bei Verwendung des beladenen Trägers auch nach mehreren Stunden weiter abfallen, erhält man bei Verwendung des unbeladenen Trägers ab einer Zeit von 4 Stunden nur geringfügig veränderte Werte.

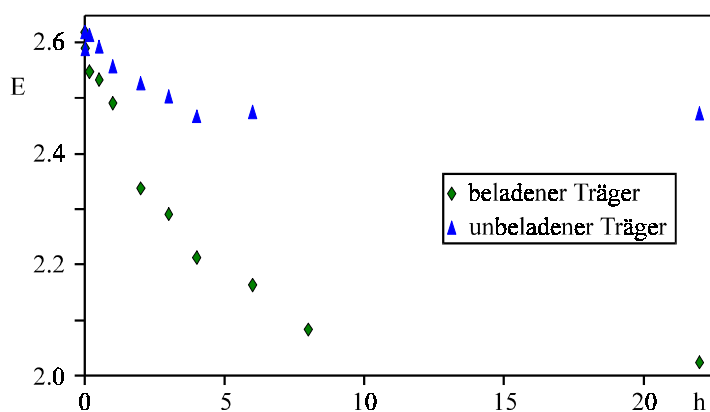


Abb. 89: Abnahme der Extinktion einer wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin bei 252 nm infolge Behandlung mit einem unbeladenen (**64**) sowie einem mit  $\text{trans-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^5\text{-DMTr-Thyd}_\text{H})]$  beladenen LCAA-CPG - Träger (**66a**)

Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Erreichen eines Adsorptionsgleichgewichtes, für eine genaue Aussage hierüber sind die durchgeführten Messungen jedoch nicht ausreichend. Die gegenüber den Meßwerten bei Verwendung des unbeladenen Trägers deutlich stärkere Abnahme der Extinktion bei Verwendung des beladenen Trägers läßt auf einen Austausch des

Chloroliganden am Platin gegen 2'-Desoxyguanosin schließen. Einen noch deutlicheren Hinweis stellen die HPL-Chromatogramme Abb. 90a und Abb. 90b dar. Hier wurde der trägergebundene Chloroplatinkomplex (**66a**) für einen Tag bei 60°C und einen weiteren Tag bei Raumtemperatur mit einer gesättigten wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 behandelt, mit Wasser gewaschen, mit einer 1 % Lösung von Dichloressigsäure in 1,2-Dichlorethan detrityliert und mit konz. Ammoniaklösung (Abb. 90a) bzw. 0.18 M Natronlauge (Abb. 90b) vom Träger abgespalten.

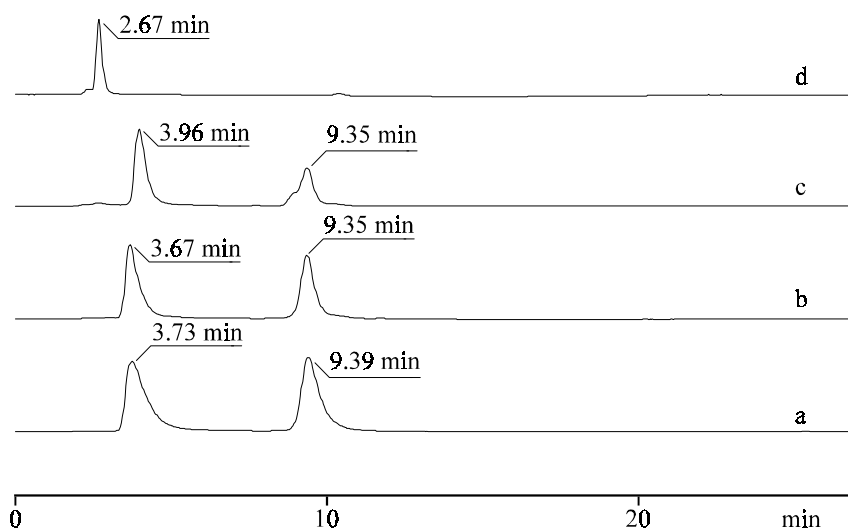
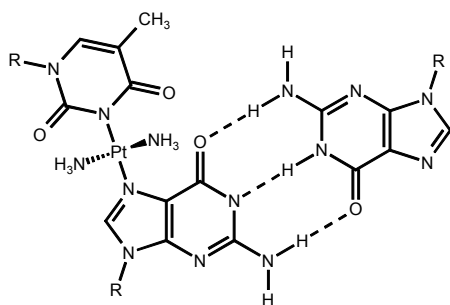


Abb. 90: HPL-Chromatogramme der Lösung der Umsetzung einer gesättigten wäßrigen Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0, mit 3'-trägergebundenem *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) nach Abspaltung vom Träger a) mit konz. NH<sub>3</sub>, b) mit 0.18 M NaOH, c) der Umsetzung mit *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)] in Lösung sowie d) von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)]

Die Substanzpeaks bei 9.39 bzw. 9.35 min können 2'-Desoxyguanosin zugeordnet werden. Dies wurde durch mehrere HPLC - Vergleiche der Probe des in Abb. 90c dargestellten Chromatogramms mit 2'-Desoxyguanosin bestätigt. Bei dieser Probe handelt es sich um die in Lösung durchgeführte Vergleichsreaktion der Umsetzung von 2'-Desoxyguanosin mit *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>H</sub>)]. Die Anwesenheit von 2'-Desoxyguanosin läßt sich auf die in der Literatur beschriebenen Neigung von N<sup>7</sup> - platinierter Guaninderivate zur Ausbildung einer Basenpaarung des deprotonierten und N<sup>7</sup> - platinierter Guaninderivates mit einem (unplatinierter) Guaninderivat zurückführen (Abb. 91) [11]. Der pK<sub>a</sub> - Wert von N<sup>7</sup> - platinierter Guanosin beträgt ca. 8 [11]. Die Bedingungen sowohl der am Träger durchgeführten Platinierung als auch der in Lösung durchgeführten Reaktion wurden so gewählt, daß die Bildung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-dGua)(Thyd<sub>H</sub>)]<sup>+</sup> zu erwarten ist. Während die am Träger durchgeführte Reaktion unabhängig von der Methode der Abspaltung vom Träger der HPLC - Untersuchung zufolge zum gleichen Produkt geführt hat, kann dies für die in Lösung durchgeführte Reaktion aus dieser Untersuchung nicht eindeutig abgeleitet werden. Es deutet jedoch klar darauf hin, da die beobachteten Abweichungen der Retentionszeiten von 3.96 min (Abb. 90c) und 3.67 min (Abb. 90b) bzw. 3.73 min (Abb. 90a) relativ gering sind.



R: β-D-2-Desoxyribofuranosyl

Abb. 91: Basenpaarung des deprotonierten und N<sup>7</sup>-platinierter 2'-Desoxyguanosins (*trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-dGua<sub>-H</sub>)(Thyd<sub>-H</sub>))] mit 2'-Desoxyguanosin

Zusätzlich erkennt man in Abb. 90c vor dem Peak von 2'-Desoxyguanosin bei 9.35 min eine Schulter, die einer weiteren Substanz zugeordnet werden muß. Wahrscheinlich ist die Entstehung des N<sup>1</sup>-platinierter Isomeren *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>1</sup>-dGua<sub>-H</sub>)(Thyd<sub>-H</sub>)] in geringer Menge. Als Vergleich ist weiterhin das HPL-Chromatogramm von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>-H</sub>)] in Abb. 90d dargestellt.

### ***Synthese von Oligonucleotiden mit immobilisiertem *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd<sub>-H</sub>)] (66a)***

Mit diesem trägergebundenen platinierter Nucleosid (**66a**) wurden mehrere Oligonucleotidsynthesen durchgeführt. Als Lösungsmittelgemisch für die Synthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren fand Lut/AN im Verhältnis von 1/1 Verwendung. Wie bereits gezeigt wurde, ist der Austausch des Chloroliganden am Platin gegen 2,6-Lutidin im Gegensatz zu Pyridin bei Temperaturen bis 50°C nicht zu erwarten (Abb. 60). Die Oxidation am Ende der Oligonucleotidsynthese erfolgte mit einer Lösung von 2 % Iod in 2,6-Lutidin/Wasser = 98/2. Zusätzlich zu der sonst durchgeführten Prozedur wurde das synthetisierte platinierter Oligonucleotid noch vor der Entschützung und Abspaltung vom Träger für 24 Stunden in einer 0.01 M Natriumacetat - Pufferlösung mit dem pH - Wert von pH = 5.0 bei 50°C behandelt, um eine Koordination der N<sup>7</sup>- Position von (im Oligonucleotid vorhandenen) Guanin am Platin durch Austausch des Chloroliganden zu gewährleisten (vgl. Abschnitt 4, Abb. 12). Unter den gewählten Bedingungen sollte diese Reaktion selektiv verlaufen (vgl. Abschnitt 2), dabei kann die Reaktion jedoch sowohl inter- als auch intramolekular ablaufen und daher sowohl zu verschiedenen *interstrand-crosslinks* als auch zu einem (oder mehreren) *intrastrand-crosslink* führen. In Abb. 92a ist das HPL-Chromatogramm des Produktgemisches der Synthese von d(CG CX), wobei für X das beschriebene 3'-trägergebundene *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>-H</sub>)] (**66a**) als Startnucleosid verwendet wurde, nach 24 h Reaktion in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C und Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub> dargestellt.

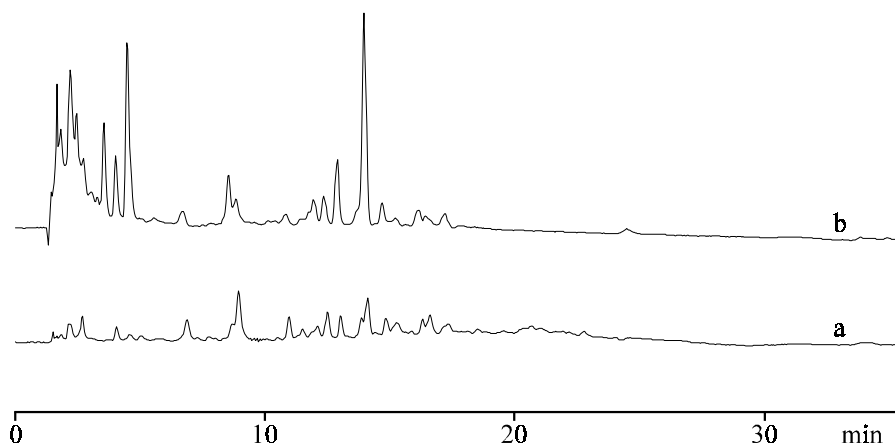


Abb. 92: HPL-Chromatogramme der Produktgemische der Synthese von d(CG CX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) mit dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN nach 24 h in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C und Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub> a) vor und b) nach Deplatinierung mit CN<sup>-</sup>

Erkennbar ist eine Vielzahl von kleinen Substanzpeaks, ein Hauptprodukt ist jedoch nicht erkennbar. Nach Deplatinierung mit Cyanidionen dagegen ist ein Hauptprodukt bei 14.0 Minuten erkennbar, das dem unmodifizierten d(CGCT) zugeordnet werden kann (Abb. 92b). Es ist anzunehmen, daß es hier zum Auftreten unspezifischer Wechselwirkungen des Platins kommt, wie sie bereits in Abschnitt 7.2 beschrieben wurden. Bestätigt wird dies durch die in Abb. 93 dargestellte Gelelektrophorese. In Bahn 1 ist deutlich ein „Schmier“ erkennbar, wie in diesem Zusammenhang bereits vorher beobachtet wurde (vgl. Abb. 64). Nach Deplatinierung ist dieser „Schmier“ nicht mehr zu beobachten (Abb. 93, Bahn 2), das entstehende Hauptprodukt kann dem unmodifizierte 4-mer zugeordnet werden. Dies kann aus dem auf Bahn 3 in vergleichbarer Höhe erkennbaren unmodifizierten 4-mer d(CTCA) geschlossen werden. Bei der Synthese eines längeren Oligonucleotides (12-mer) unter gleichen Bedingungen wurde ein vergleichbares Resultat erzielt.

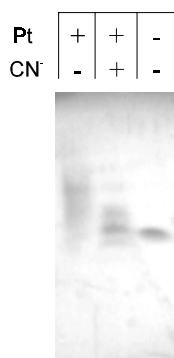


Abb. 93: Gelelektrophorese der Produktgemische der Synthese von d(CG CX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) mit dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN nach 24 h in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C, Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub> und Entsalzung mit Sephadex G-10 vor (Bahn 1) und nach Deplatinierung mit CN<sup>-</sup> (Bahn 2) sowie von d(CTCA) (Bahn 3) in 20 % Acrylamid/Bisacrylamid + 7 M Harnstoff

Verwendet man zur Entschützung des Oligonucleotides und dessen Abspaltung vom Träger Natronlauge, zeigt sich erwartungsgemäß ein anderes Ergebnis (vgl. Abschnitt 7.4, Abb. 73a und Abb. 73c). Zusätzlich wurde auch die Sequenz etwas geändert, anstelle von Cytosin wurde Thymin eingebaut. Nach analoger Behandlung in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) bei 50°C für 24 Stunden und Entblockung mit Natronlauge sind im HPL-Chromatogramm der mit Essigsäure neutralisierten Lösung mehrere Produkte erkennbar (Abb. 94).

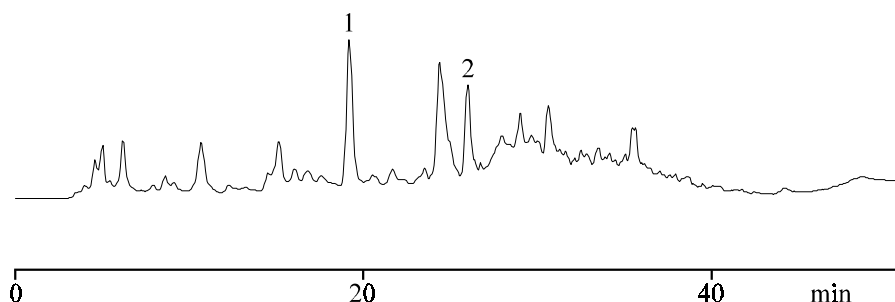


Abb. 94: HPL-Chromatogramm des Produktgemisches der Synthese von d(TGTX) ( $X = 3'$ -trägergebundenes  $trans$ -[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) mit dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN nach 24 h in 0.01 M Natriumacetat - Puffer, pH = 5.0 bei 50°C und Entblockung mit 0.15 M NaOH

Die in Abb. 94 mit 1 und 2 markierten Produkte wurden isoliert und weitergehend charakterisiert, der bei 24.3 Minuten erkennbare Peak mit relativ großem Tailing stellt hingegen keine einzelne Substanz dar und wurde daher nicht weiter untersucht. In Abb. 95a bzw. Abb. 95b sind die HPL-Chromatogramme dieser isolierten Produktpeaks dargestellt.

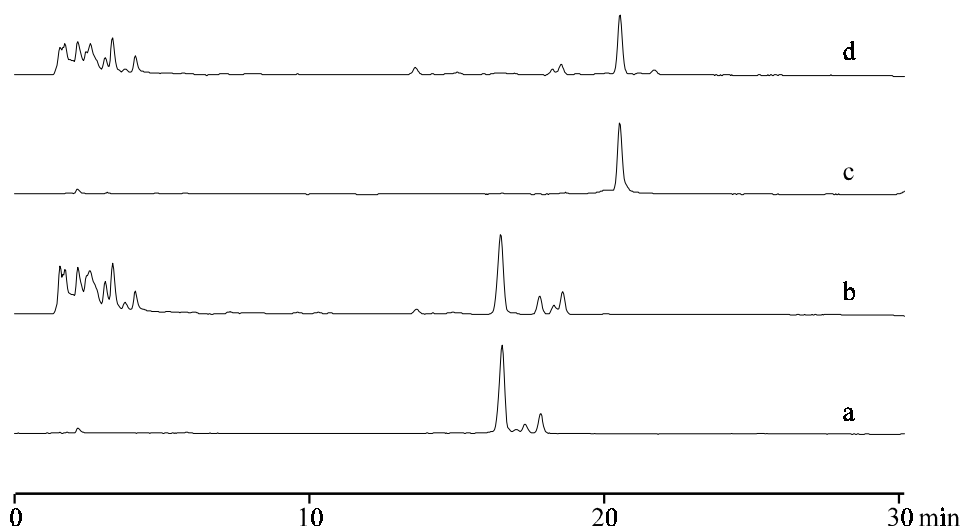


Abb. 95: HPL-Chromatogramme der in Abb. 94 a) mit 1 sowie c) mit 2 markierten isolierten Produktpeaks vor sowie b) bzw. d) nach Deplatinierung mit CN<sup>-</sup>

Obwohl das Produkt des in Abb. 95a gezeigten Chromatogramms einige Verunreinigungen erkennen läßt, erscheint eine Untersuchung sinnvoll, da diese im Verhältnis zum Produkt gering sind. In den Abb. 95b sowie Abb. 95d sind die HPL-Chromatogramme der isolierten



Produkte nach Cyanidbehandlung dargestellt. Beide Produkte werden nur zu einem sehr geringen Teil deplatinert (Abb. 95b, Abb. 95d). Dies läßt auf sehr stabile *crosslinks* schließen. Trotz der geringen Deplatinierung sind in Abb. 95b bei 18.6 min und in Abb. 95d bei 18.5 min neue Substanzpeaks erkennbar, die der gleichen Substanz zugeordnet werden können. Sehr wahrscheinlich entsteht hier das entsprechende unmodifizierte 4-mer d(TGTT). Dies läßt weiterhin die Schlußfolgerungen zu, daß das in Abb. 94 mit 1 markierte Produkt ein Oligonucleotid mit *intrastrand-crosslink* ist, das in Abb. 94 mit 2 markierte Produkt hingegen ein Oligonucleotid mit *interstrand-crosslink* darstellt. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorbehalt zu betrachten, da einerseits das isolierte Produkt 1 (Abb. 94) noch verunreinigt ist und andererseits das Ausmaß der beobachteten Deplatinierung sehr gering ist.

Diese prinzipielle Zuordnung wird bestätigt durch die nach enzymatischer Hydrolyse des Produktes 1 (Abb. 95a) bei 28.0 und 32.5 Minuten erkennbaren Peaks (Abb. 96a), wobei letzterer dem völlig unhydrolysierten Produkt entsprechen sollte (vgl. Abb. 74a). Vergleichbare Peaks sind in Abb. 96b in deutlich geringer Größenordnung erkennbar.

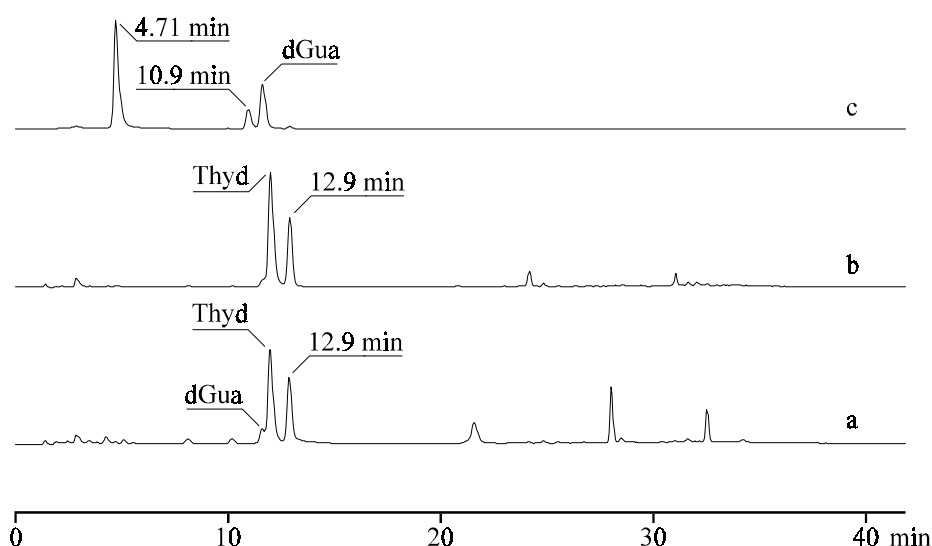


Abb. 96: HPL-Chromatogramme der in Abb. 94 a) mit 1 sowie b) mit 2 markierten isolierten Produktpeaks nach enzymatischer Hydrolyse mit Schlangengift - Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase, c) HPL-Chromatogramm der Produkte der Umsetzung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) mit  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_H)]$

Dies deutet auf ein etwas leichter hydrolysierbares Oligonucleotid mit *interstrand-crosslink* hin. In Abb. 96c ist die bereits in Abb. 90c chromatographisch dargestellte Probe der Produkte der Umsetzung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) mit  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_H)]$  gezeigt. In den Chromatogrammen beider enzymatisch hydrolysierten Produkte ist ein großer Substanzpeak bei 12.9 Minuten erkennbar. Der Vergleich mit Abb. 96c zeigt, daß hier nicht das dem Peak bei 4.71 Minuten zuzuordnende  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2(N^7-dGua)(N^3-Thyd_H)]^+$  entsteht. Eine mögliche Erklärung ist, daß  $trans-[Pt^{II}(NH_3)_2(N^7-dGua)\{(TT)-N^3-T(2)\}]^+$  entsteht und unter diesen Bedingungen nicht weiter

abgebaut wird. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß es während der Entblockung für 20 Stunden in 0.15 M Natronlauge bei 30°C eine Platin - Isomerisierungsreaktion gegeben hat, wobei sich das N<sup>1</sup>-platinierter Isomer gebildet hat. Dies ist jedoch nicht zu erwarten, die mit 2'-Desoxyguanosin analog durchgeführte Reaktion läßt nicht auf einen solchen Austausch schließen (Abb. 90a und Abb. 90b). Eine Isomerisierung zu N<sup>3</sup> von Thymidin wäre prinzipiell auch denkbar, in diesem Fall müßte jedoch ein deutlich sichtbarer Peak von 2'-Desoxyguanosin zu beobachten sein, dies ist aber nicht so. Bei dem in Abb. 96c bei 10.9 Minuten sichtbaren Substanzpeak könnte es sich, wie bereits erwähnt, um *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>1</sup>-dGua<sub>H</sub>)(N<sup>3</sup>-Thyd<sub>H</sub>)] handeln, eine sichere Zuordnung kann jedoch nicht getroffen werden. Abschließend zu der Synthese von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(TGTT)-N<sup>7</sup>-G(2),N<sup>3</sup>-T(4)}]<sup>+</sup> muß bemerkt werden, daß die durchgeführten Untersuchungen eine genaue Charakterisierung der Produkte nicht zulassen. Nach bisherigen Erkenntnissen deutet alles darauf hin, daß der in Abb. 94 mit 1 markierte Produktpeak dem gewünschten Zielprodukt *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(TGTT)-N<sup>7</sup>-G(2),N<sup>3</sup>-T(4)}]<sup>+</sup> entspricht.

Neben Synthesen nach dem H-Phosphonat - Verfahren wurde das 3'-trägergebundene *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) auch für Oligonucleotidsynthesen nach dem Amidit - Verfahren verwendet. Das HPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von d(CTTGTTACCAGCX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**)) nach Entblockung mit konz. Ammoniaklösung ist in Abb. 97 dargestellt.

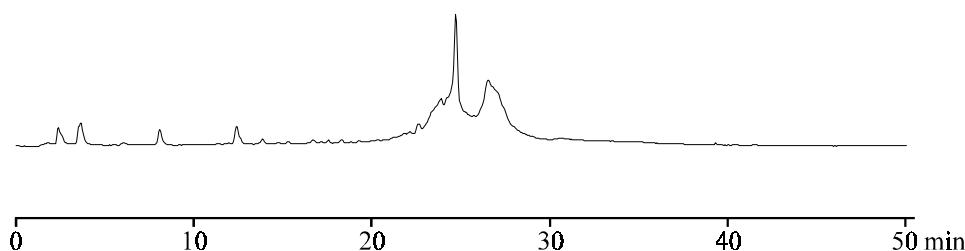


Abb. 97: HPL-Chromatogramm der Produkte der Synthese von d(CTTGTTACCAGCX) (X = 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) nach Entblockung mit konz. NH<sub>3</sub>

Der im Bereich von 26 - 27 Minuten erkennbare breite Peak läßt auf die Entstehung eines oder mehrerer *crosslinks* schließen. Die gleiche Synthese wurde auch mit **66a** nach 24 Stunden Behandlung mit einer gesättigten Lösung von 2'-Desoxyguanosin in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) durchgeführt (Abb. 98a). Hierbei sollte als Hauptprodukt *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-dGua){d(CTTGTTACCAGCT)-N<sup>3</sup>-T(12)}]<sup>+</sup> entstehen und die Möglichkeit der Ausbildung eines *crosslinks* direkt nach der Oligonucleotidsynthese prinzipiell zeigen. Hier ist der in Abb. 97 erkennbare breite Peak bei 27 Minuten in sichtbar geringerer Größenordnung erkennbar. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Ausbildung der *crosslinks* vorwiegend nach der Oligonucleotidsynthese, d.h. während der Behandlung in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) erfolgt.

Die Effekte der unspezifischen Wechselwirkungen des Platins, die nach Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  der mit dem H-Phosphonat - Verfahren synthetisierten Oligonucleotide auftreten (vgl. Abb. 93, Bahn 1 sowie Abb. 92), sind bei keiner der beiden hier besprochenen Synthesen zu beobachten. Dies kann durch das Abfangen der reaktiven Platinspezies während der *crosslink* - Bildung bzw. der Entblockung durch 1H-Tetrazol erklärt werden. Nach Deplatinierung der in Abb. 98a dargestellten Probe mit Cyanidionen ist für das Hauptprodukt keine Änderung der Retentionszeit festzustellen (Abb. 98b).

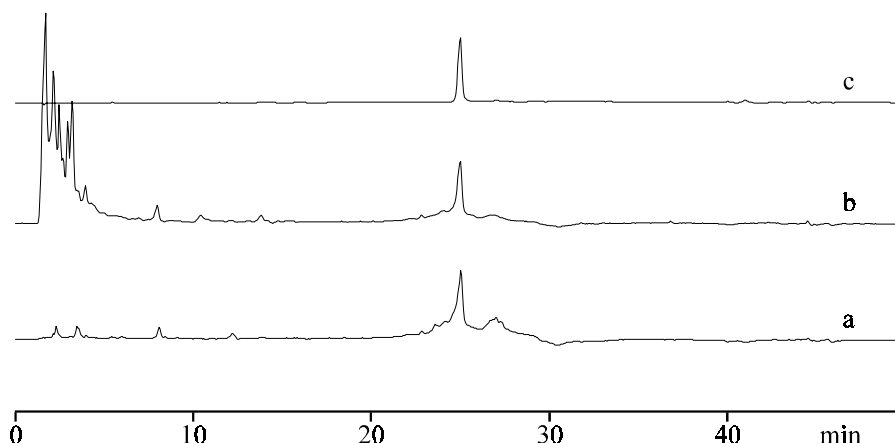


Abb. 98: HPL-Chromatogramme der Produkte der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) ( $X = 3'$ -trägergebundenes  $\text{trans-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^5\text{-DMTr-Thyd}_\text{H})]$  (**66a**) nach Reaktion mit dGua<sub>sa</sub> in 0.01 M Natriumacetat - Puffer (pH = 5.0) für 24 h bei 50°C und Entblockung mit konz.  $\text{NH}_3$  a) vor sowie b) nach Behandlung mit  $\text{CN}^-$ , c) HPL-Chromatogramm von d(CTTGTACCAGCT)

Gleichzeitig stimmt diese Retentionszeit mit der des unmodifizierten Oligos gleicher Sequenz überein (Abb. 98c). Dies kann als Hinweis auf eine weitgehende Deplatinierung des Oligonucleotides möglicherweise durch Reaktion des Platins mit 1H-Tetrazol gewertet werden. Der in Abb. 97 erkennbare, bereits erwähnte breite Peak wurde isoliert (Abb. 99a) und gleichfalls mit Cyanidionen behandelt. Dabei erfolgt teilweise Deplatinierung (Abb. 99b), der entstehende Substanzpeak hat erwartungsgemäß die gleiche Retentionszeit wie das entsprechende unmodifizierte 12-mer d(CTTGTACCAGCT) (Abb. 99c).

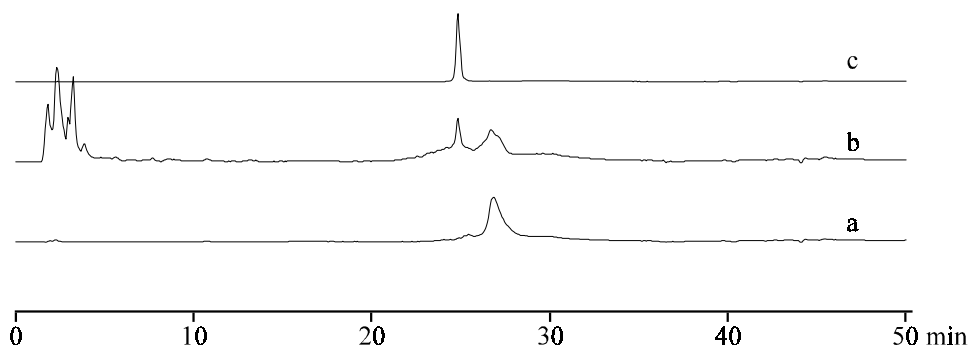


Abb. 99: HPL-Chromatogramme eines Produktpeaks der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) ( $X = \text{Pt-T}$ ) a) vor sowie b) nach Behandlung mit  $\text{CN}^-$ , c) HPL-Chromatogramm von d(CTTGTACCAGCT)

Diese Untersuchung wurde gleichfalls gelelektrophoretisch durchgeführt (Abb. 100). Die Deplatinierung verursacht einen deutlichen „shift“. Dieser ist deutlich größer, als dies bei der Deplatinierung von  $trans\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Py}\{\text{d}(\text{ATAGTATACAGA})\text{-N}^3\text{-T(7)}\}]^+$  beobachtet wurde (Abb. 44, Bild B).

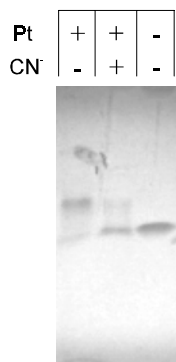


Abb. 100: Gelelektrophorese eines Produktpeaks der Synthese von  $\text{d}(\text{CTTGTACCAGCX})$  ( $\text{X} = \text{Pt-T}$ ) vor (Bahn 1) und nach Deplatinierung mit  $\text{CN}^-$  (Bahn 2) sowie von  $\text{d}(\text{CTTGTACCAGCT})$  (Bahn 3)

Zur Klärung der Frage, ob dieses isolierte Produkt ein *intrastrand*- oder *interstrand-crosslink* enthält, wurde ein Ionenaustausch - HPL-Chromatogramm aufgenommen (Abb. 101a), drei unmodifizierte Oligonucleotide verschiedener Länge lassen eine grobe Abschätzung der Länge des Produktes mit *crosslink* zu. Obwohl der Substanzpeak des Produktes mit *crosslink* im iHPL-Chromatogramm sehr, sehr breit ist (Abb. 101a), stellt diese Untersuchung einen deutlichen Hinweis auf das Vorliegen eines (oder mehrerer verschiedener) *interstrand-crosslinks* zwischen zwei Oligonucleotiden dar.

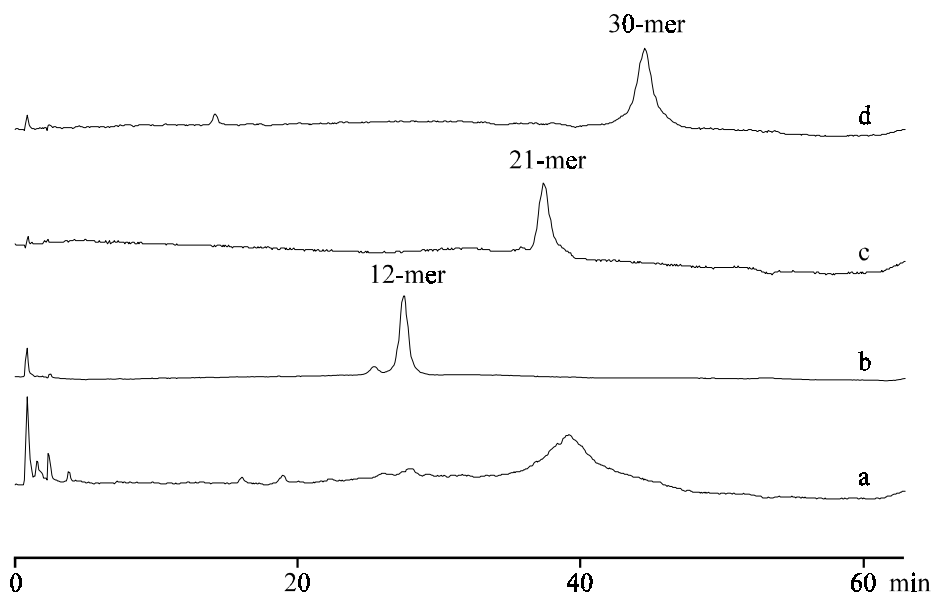


Abb. 101: iHPL-Chromatogramme a) des in Abb. 99a dargestellten isolierten Produktpeaks, b) von  $\text{d}(\text{CTTGTACCAGCT})$ , c) von  $\text{d}(\text{TCCCGGTCACTTGTACCAGCT})$  und d) von  $\text{d}(\text{AAGCTTTCCCGGTCACTTGTACCAGCTGGC})$

In Abb. 102a ist das iHPL-Chromatogramm der bereits als RP-HPL-Chromatogramm in Abb. 97 dargestellten Produkte der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) ( $X = \text{Pt-T}$ ) gezeigt. Hier bestätigt sich, daß das Hauptprodukt dieser Oligonucleotidsynthese in der Fraktion mit 11 Ladungen ( $i = 11$ , Abb. 102) erscheint, was einem 12-mer entspricht.

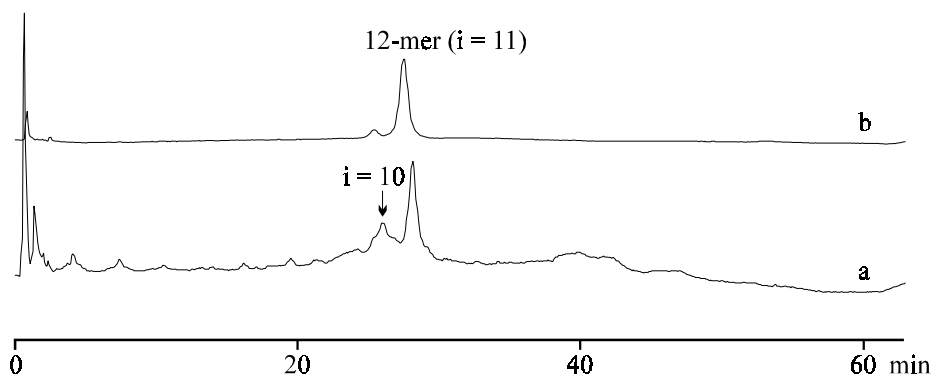


Abb. 102: iHPL-Chromatogramme a) der Produkte der Synthese von d(CTTGTACCAGCX) ( $X = 3'$ -trägergebundenes *trans*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^5\text{'-DMTr-Thyd}_\text{H})\text{Pt}^\text{II}]$  (**66a**)) nach Entblockung bzw. Entschützung mit konz.  $\text{NH}_3$  sowie b) von d(CTTGTACCAGCT)

Weiterhin ist im Chromatogramm eine Fraktion mit 10 negativen Ladungen sichtbar ( $i = 10$ , Abb. 102a). In dieser Produktfraktion ist das angestrebte Produkt *trans*- $[\text{Pt}^\text{II}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{CTTGTACCAGCT})\text{-N}^7\text{-G}(10),\text{N}^3\text{-T}(12)\}]^+$  zu erwarten. Durch die positive Ladung infolge der Platinierung an  $\text{N}^7$  von G(10) wird eine negative Ladung der 11 Phosphorsäurediesterbindungen des 12-mers kompensiert. Eine Isolierung und weitere Auftrennung dieser Fraktion erfolgte jedoch nicht mehr.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es gelungen ist, 3'-trägergebundenes *trans*- $[\text{Pt}^\text{II}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^5\text{'-DMTr-Thyd}_\text{H})]$  (**66a**) zu synthetisieren. Dieses ist geeignet, als Startnucleosid für Festphasen - Oligonucleotidsynthesen eingesetzt werden. Sowohl bei der Synthese nach dem H-Phosphonat - als auch bei der Synthese nach dem Amidit - Verfahren konnten *crosslinks* nachgewiesen werden. Für die gezielte Synthese bestimmter *crosslinks* erscheint das Amidit - Verfahren jedoch weniger geeignet, da das als Aktivierungsreagenz gewöhnlich eingesetzte 1H-Tetrazol gegen den Chloroliganden am Platin austauschen kann. Ein Ersatz für 1H-Tetrazol wäre hier jedoch denkbar. Die Nutzung des H-Phosphonat - Verfahrens, durchgeführt in 2,6-Lutidin/Acetonitril, erscheint vielversprechend. Größtes Problem stellt die unter den angewendeten Bedingungen in hohem Ausmaß ablaufende Ausbildung von *interstrand-crosslinks* als Konkurrenzreaktion zur angestrebten Formierung eines *intrastrand-crosslinks* dar. Im Hinblick darauf muß eine Optimierung der Synthese erfolgen. Bei Verwendung von konz. Ammoniaklösung zur Entblockung des Oligonucleotides vom Träger kommt es im Falle der Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren, durchgeführt in 2,6-Lutidin/Acetonitril, zu unspezifischen Wechselwirkungen, die durch Interaktion des Platins verursacht werden. Denkbar wäre es, diese durch kurzzeitige Behandlung mit einem schwächer deplatinierend wirkenden Agens wie z.B. Thioharnstoff

aufzubrechen. Nach bisherigen Ergebnissen kann dieser Effekt durch Verwendung von Natronlauge zur Entblockung weitestgehend vermieden werden.

## 9 Untersuchungen zur Synthese des Monomerenbausteines „Pt-G“

Wie bereits in der Einleitung erläutert, sollte zusätzlich zum bereits hergestellten Synthesebaustein „Pt-T“ ein weiterer Synthesebaustein „Pt-G“ synthetisiert werden. Ebenso wie bei dem Synthesebaustein „Pt-T“ (29) sollte diese Verbindung für den Einsatz mit einem DNA - Synthesautomaten geeignet sein, d.h. die 5'-Hydroxyfunktion muß die üblicherweise verwendete Dimethoxytritylschutzgruppe tragen und die 3'-Hydroxyfunktion mit der H-Phosphonat - Funktion modifiziert sein. Obwohl der Schutz der exocyclischen Aminofunktion, wie bereits in Abschnitt 3 erwähnt wurde, bei der Kupplung nach dem H-Phosphonat - Verfahren nicht notwendig ist [35], ist der Schutz der Aminogruppe für den Schutz der 5'-Hydroxyfunktion erforderlich, meist auch für die Phosphonylierung der 3'-Hydroxyfunktion. Die Platinierung ist an zwei Positionen sinnvoll, der N<sup>1</sup> - sowie der N<sup>7</sup> - Position. Im Hinblick auf die mögliche Bildung eines platinmodifizierten Watson-Crick - Basenpaares ist die Synthese eines N<sup>1</sup> - platinieren Guanosinderivates von großem Interesse [10], Literaturangaben zufolge ist die selektive Platinierung der N<sup>1</sup> - Position von Guaninderivaten auf direktem Weg nicht zu realisieren (vgl. Abschnitt 2) [10][11]. Im Gegensatz dazu ist die Platinierung der N<sup>7</sup> - Position unter sauren pH - Bedingungen selektiv möglich (vgl. Abschnitt 2). *Dalbies et al.* erzielten die Platinisomerisierungsreaktion der Bildung eines *interstrand-crosslinks* durch Umlagerung eines *1,3-intrastrand-crosslinks* infolge Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang (vgl. Abb. 1) [6]. Bei dem dabei eingesetzten Oligonucleotid mit dem *1,3-intrastrand-crosslink* war Platin beiderseits an der N<sup>7</sup> - Position eines Guanosins gebunden. Daher sollte eine Platinierung alternativ auch an dieser Position erfolgen. Bei schwach saurem pH-Wert sollte diese Platinierungsreaktion ohne auftretende Detritylierung möglich sein.

Die Synthese von N<sup>2</sup>-Dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (67) wurde nach *Kung und Jones* mit Dimethylformamid-dimethylacetal (69) in Methanol durchgeführt (Abb. 103) [35]. Die nachfolgende Dimethoxytritylierung der 5'-Hydroxyfunktion erfolgte wiederum gemäß [52], nach Extraktion mit Diethylether befand sich die Substanz jedoch nahezu quantitativ in der wäßrigen Phase. Da das Einengen mit einem Vakuumrotationsverdampfer nicht möglich war, da die Lösung während des Einengens im Vakuum aufschäumte, wurde die Lösung eingefroren und lyophilisiert. Die anschließende chromatographische Reinigung mittels Flashchromatographie ergab O<sup>5</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (68) mit zwei Mol Triethylamin (lt. NMR - Spektrum) in einer Gesamtausbeute von 98 %. Bei erneuter Durchführung dieser Synthese wurde auf den Schritt der (nicht sinnvollen) Extraktion verzichtet.

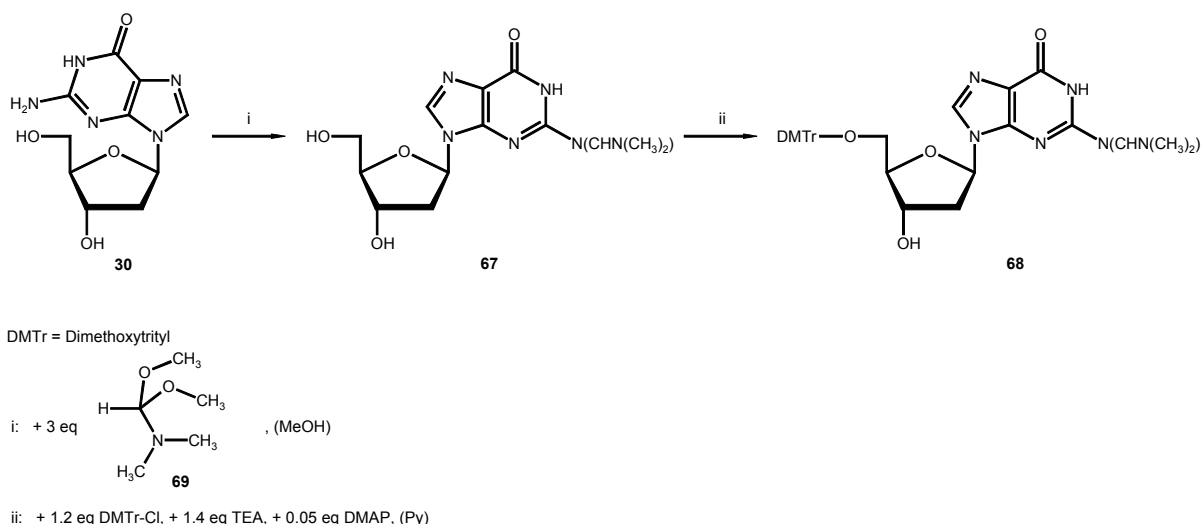


Abb. 103: Synthese von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin

Die nachfolgende Phosphonylierung wurde nicht mehr durchgeführt, hierbei sind jedoch keine größeren Probleme zu erwarten.

Wie in Abschnitt 2 beschrieben, erfolgt die Platinierung von Guanosin an der N<sup>1</sup> - Position nach Deprotonierung von N<sup>1</sup>-H. Es wurde daher vermutet, daß die Platinierung der N<sup>1</sup> - Position in analoger Weise zur durchgeführten Platinierung von Thymidin für O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin bzw. O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin-3'-H-phosphonat möglich ist. Zur Untersuchung der Platinierungsreaktion wurde auf die H-Phosphonat - Gruppe verzichtet (Abb. 104).

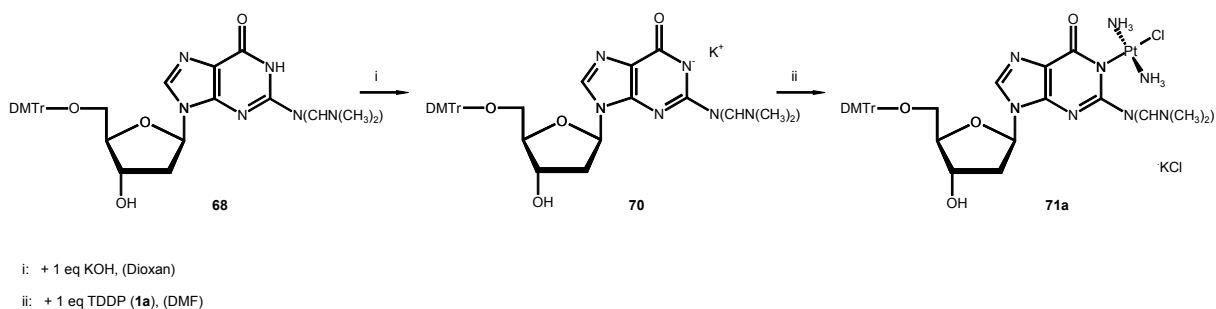


Abb. 104: Syntheseweg der Platinierung der N<sup>1</sup>-Position von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (68)

Ausgehend von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (68) erfolgte die Umsetzung mit einem eq ca. 1 M KOH. Dabei wurde O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (68) in Dioxan gelöst, die KOH - Lösung zugegeben, sofort eingefroren, um die Abspaltung der Dimethylaminomethylenschutzgruppe zu verhindern, und lyophilisiert.



### Analytische Charakterisierung des Zwischenproduktes 70

Die Bestätigung für die erfolgreich durchgeführte Reaktion liefert das  $^1\text{H}$ -NMR - Spektrum des hergestellten Kalium- $\text{O}^{5'}$ -dimethoxytrityl- $\text{N}^2$ -dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylates (**70**) (Abb. 105b).

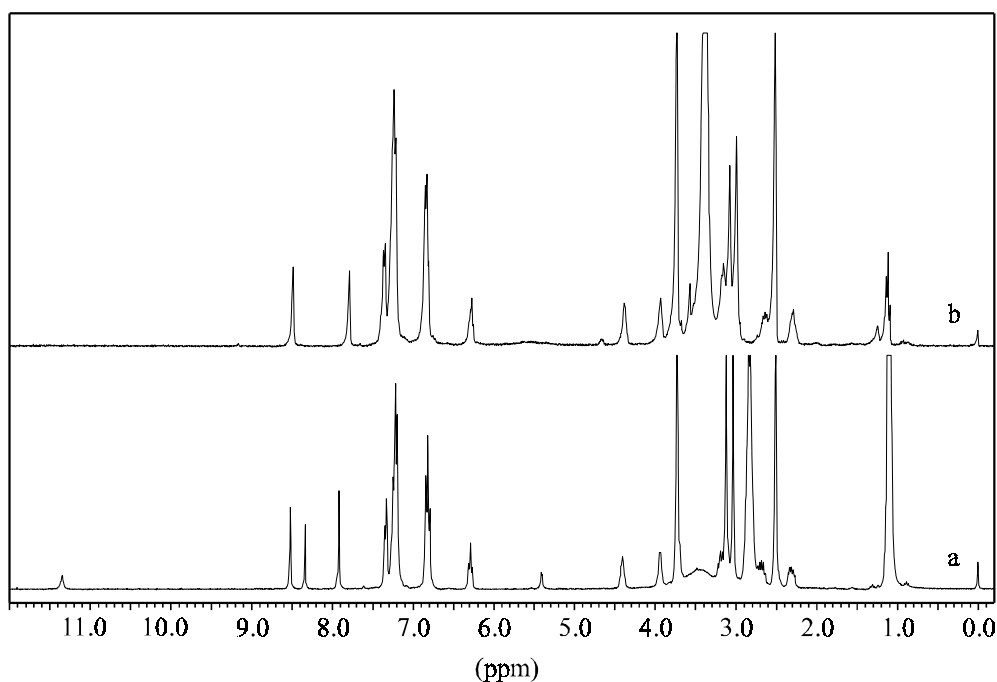


Abb. 105:  $^1\text{H}$ -NMR - Spektren a) von  $\text{O}^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $\text{N}^2$ -dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) und b) Kalium- $\text{O}^{5'}$ -dimethoxytrityl- $\text{N}^2$ -dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylat (**70**) in  $\text{DMSO}-d_6$

Charakteristisch ist die Hochfeldverschiebung von H-8 von 7.91 ppm vor der Reaktion auf 7.87 ppm infolge vollständiger Deprotonierung. Weiterhin spricht die Einheitlichkeit des Signals von H-8 gegen eine teilweise Abspaltung der Dimethylaminomethylen - Schutzgruppe. Verschiedene Chargen von synthetisiertem  $\text{O}^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $\text{N}^2$ -dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) zeigten für die beiden Signale bei 8.33 ppm und 11.35 ppm unterschiedliche Anteile, die Integrale beider Signale ergänzen sich dabei stets zu etwa einem Proton. Dies läßt mutmaßen, daß das acide Proton an  $\text{N}^1\text{-H}$  teilweise an Triethylamin gebunden ist. Das Signal bei 11.35 ppm ist dem  $\text{N}^1\text{-H}$  zuzuordnen, es wird vermutet, daß das Signal bei 8.33 ppm dem aciden Proton eines Triethylammoniums, das über eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem zweiten TEA - Molekül verbunden ist, zuzuordnen ist. Dies wird indirekt bestätigt durch die zweidimensionalen NMR-Spektren von  $\text{O}^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $\text{N}^2$ -dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) sowie von der entsprechenden  $\text{N}^1$ -platiniierten Verbindung, hier konnte für dieses Signal keine Kopplung mit einem anderen Kern gefunden werden (Abb. 107, Abb. 108, Tabelle 5). Das acide  $\text{N}^1\text{-H}$

Signal von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) bei 11.35 ppm sowie das Signal bei 8.33 ppm fehlen erwartungsgemäß völlig. Das Dimethylaminomethylenproton ist im Unterschied zu dem Signal von H-8 nicht signifikant verschoben (8.51 ppm bei Kalium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylat (**70**), 8.52 ppm bei O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**), alle chemischen Verschiebungen in DMSO-d<sub>6</sub>).

### Die Platinierungsreaktion

Das so erhaltene Kalium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylat (**70**) wurde zu Beginn mit 1 eq *trans*-Platin (**1a**) in DMF umgesetzt (6 h bei 60°C, 1 d bei Raumtemperatur, Abb. 104). Die Platinierungsreaktion läuft jedoch auch bei Umsetzung mit *trans*-Platin (**1a**) im Überschuß (ca. 1.5 eq) nicht vollständig ab, dünnschichtchromatographisch war stets eine Umsetzung von **70** von knapp 50 % abschätzbar. Ursache dafür ist vermutlich eine sterische Hinderung durch die Dimethylaminomethylen - Gruppe. Dies macht eine chromatographische Trennung erforderlich. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde das Kaliumnucleosidsalz **70** schließlich im Überschuß einzusetzen. Die säulenchromatographische Reinigung an silanisiertem Kieselgel in Chloroform/Methanol = 95/5 schlug fehl, daher erfolgte die Reinigung an Kieselgel in Chloroform/Methanol = 85/15 bis 8/2 unter Zusatz von geringen Mengen Triethylamin zum Laufmittel. Dies ergab ein platinirtes Produkt mit etwa 25 % Ausbeute in Bezug auf das eingesetzte *trans*-Platin (**1a**). Die geringe Ausbeute erklärt sich einerseits aus der nur teilweise ablaufenden Umsetzung und andererseits aus Substanzverlusten während der chromatographischen Reinigung an Kieselgel infolge Austausch des Chloroliganden.

### Analytische Charakterisierung

Das FIR - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) zeigt eine Bande bei  $\nu = 336 \text{ cm}^{-1}$  (CsBr), die der Pt-Cl - Valenzschwingung zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 34). In Abb. 106 ist das <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum der isolierten Verbindung (**71a**) in DMF-d<sub>7</sub> abgebildet. Bei 4.38 ppm ist deutlich ein großes Signal im <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum erkennbar, welches den am Platin koordinierten Ammoniakmolekülen zuzuordnen ist. Die Position der Platinierung ist aus diesem Spektrum jedoch nicht abzuleiten. Weiterhin können die Signale von H-8 und dem Methylen - Proton der Dimethylaminomethylenschutzgruppe nicht eindeutig zugeordnet werden.

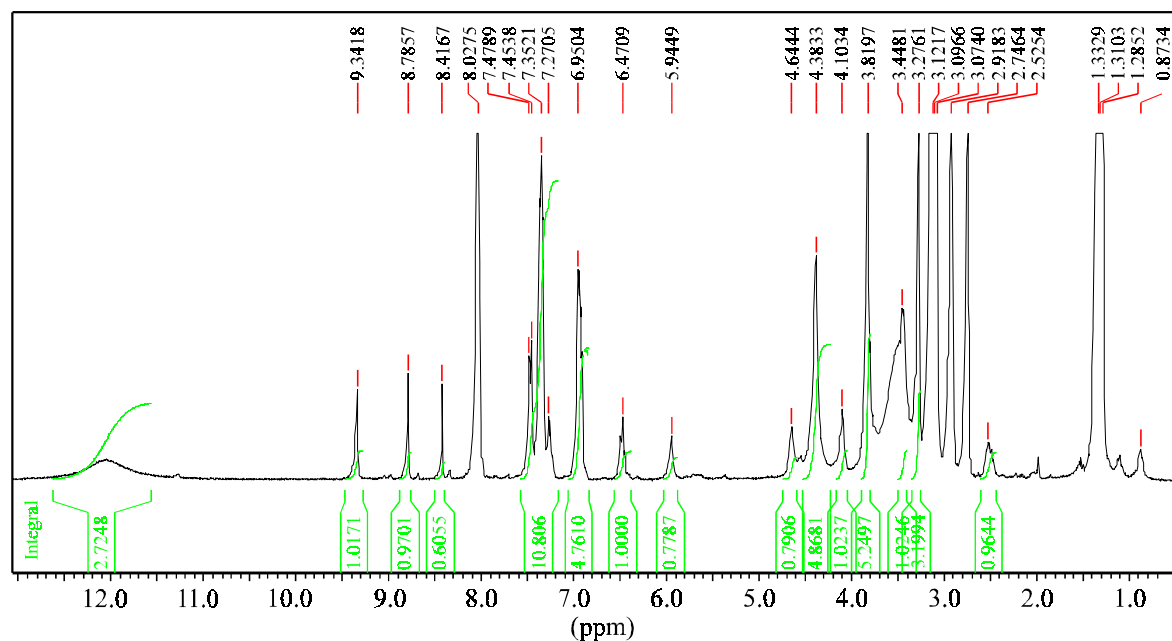


Abb. 106:  $^1\text{H}$ -NMR - Spektrum von  $\text{trans}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{N}^1\text{-(O}^5'\text{-DMTr-N}^2\text{-DMAM-dGua}_\text{H}))]$  (**71a**) in  $\text{DMF-d}_7$

Zur Überprüfung der Platinierungsposition wurde die isolierte Verbindung daher durch zweidimensionale NMR charakterisiert. Das  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HMQC erlaubt die Zuordnung aller primären, sekundären und tertiären Kohlenstoffatome, bei denen die Protonen eindeutig zugeordnet werden können (Abb. 107).

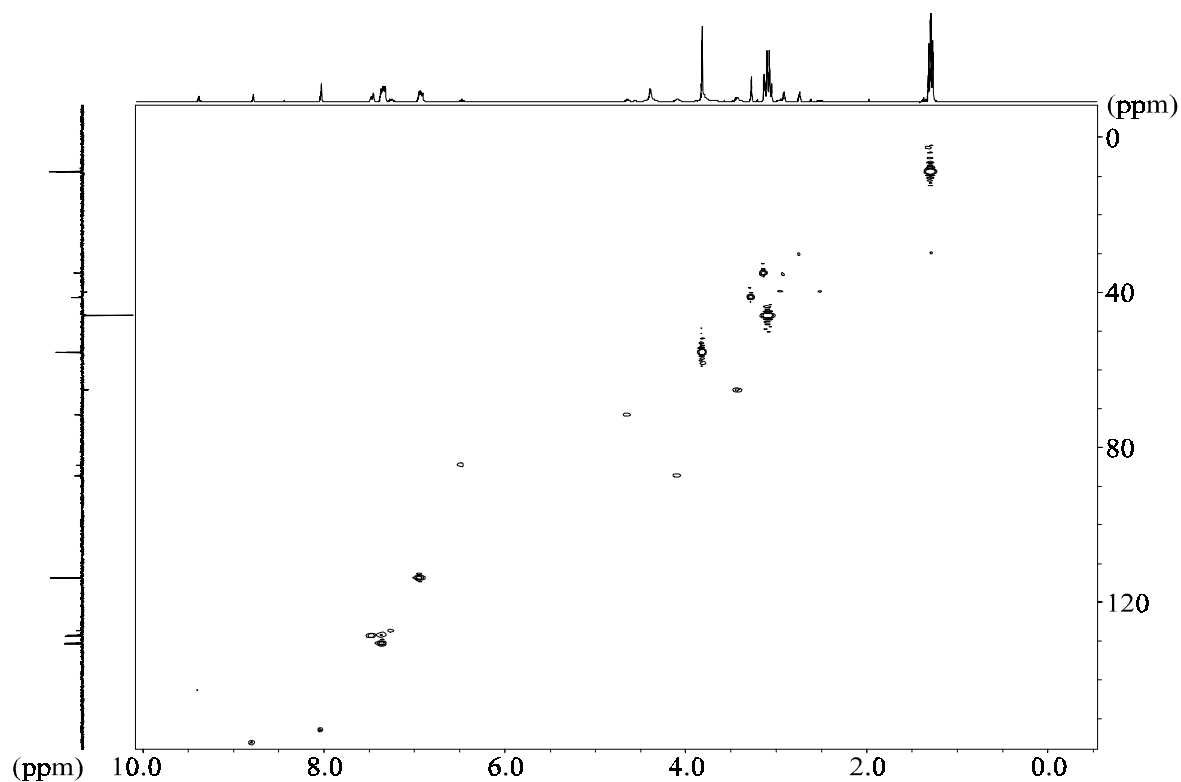


Abb. 107:  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HMQC - Spektrum von  $\text{trans}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{N}^1\text{-(O}^5'\text{-DMTr-N}^2\text{-DMAM-dGua}_\text{H}))]$  (**71a**) in  $\text{DMF-d}_7$

Die Kopplung eines Methylkohlenstoffatoms der Dimethylaminomethylengruppe mit dem Methylen - Proton im  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HMBC - Spektrum erlaubt die Zuordnung dieses Protons im  $^1\text{H}$ -NMR - Spektrum (Abb. 108). Weiterhin koppelt das Methylen - Proton mit C-2. Das Methylen - Kohlenstoffatom koppelt mit den Methylprotonen beider Methylgruppen der Dimethylaminomethylengruppe. H-8 koppelt mit C-4 und C-5, so können alle drei Atome zugeordnet werden. Die Zuordnung von H-8 ermöglicht mit Hilfe des HMQC - Spektrums die Zuordnung von C-8, die Kopplung ist jedoch nur schwach zu beobachten (Abb. 107). Die Kopplungen von C-4 mit H-1' und von C-8 mit H-1' sind im Gegensatz zu dem  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HMBC - Spektrum der unplatinierten Verbindung in Abb. 108 nicht erkennbar. In dem Vergleichsspektrum der unplatinierten Verbindung kann so C-4 und C-5 eindeutig zugeordnet werden. Durch Vergleich der Spektren des platinierten sowie des unplatinierten Nucleosides können diese Signale auch für das platinierte Nucleosid zugeordnet werden. Gleichfalls nur im Spektrum der unplatinierten Verbindung erkennbar ist die schwache Kopplung von H-8 mit C-6, durch die Zuordnung aller anderen Signale des  $^{13}\text{C}$ -NMR - Spektrums von **71a** kann auch dieses Kohlenstoffatom zugeordnet werden.

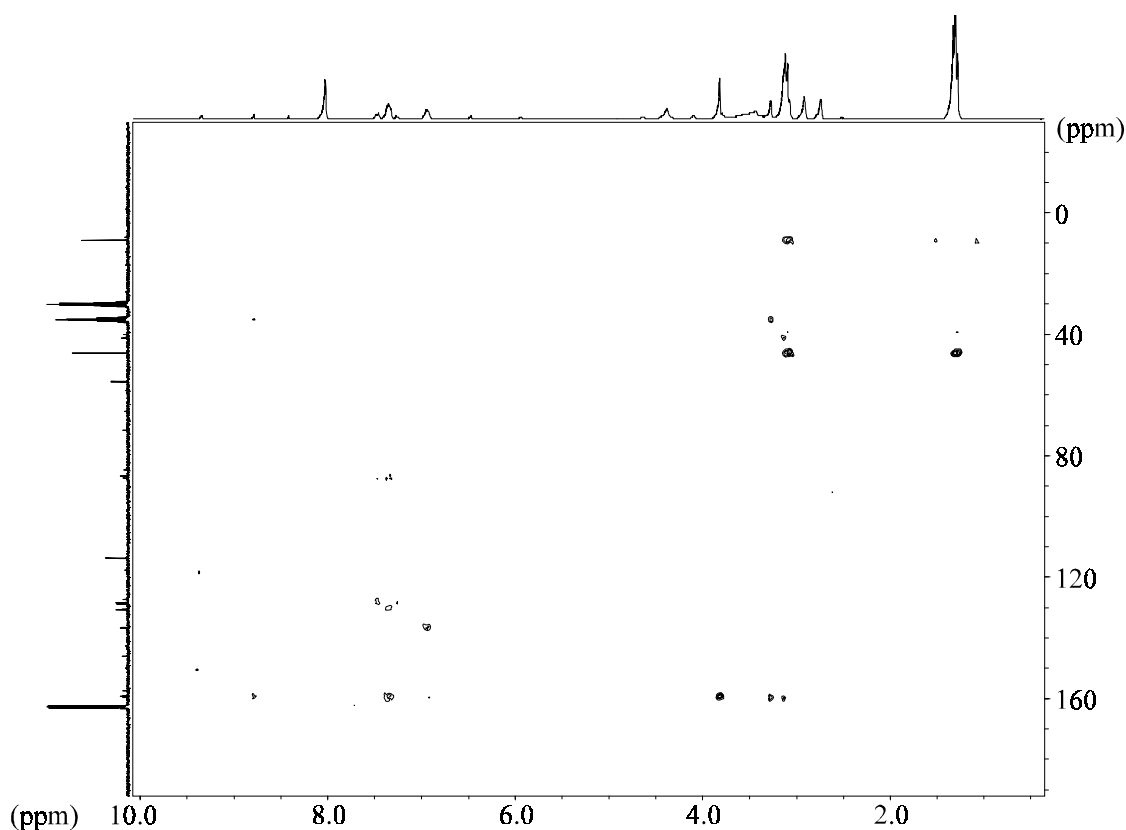


Abb. 108:  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HMBC - Spektrum von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) in DMF-d<sub>7</sub>

Die zugeordneten chemischen Verschiebungen  $\delta$  der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Atome sind in Tabelle 5 bzw. Tabelle 6 zusammengefaßt. Aus Tabelle 5 wird deutlich, daß H-8 von 7.99 ppm vor der Platinierung auf 9.34 ppm deutlich zu tieferm Feld hin verschoben ist.

Tabelle 5: Chemische Verschiebungen  $\delta$  (ppm) der  $^1\text{H}$ -Atome von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) und O<sup>5</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua (**68**) in DMF-d<sub>7</sub>

O <sup>5</sup> -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua ( <b>68</b> )	<i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(N <sup>1</sup> -(O <sup>5</sup> -DMTr-N <sup>2</sup> -DMAM-dGua <sub>H</sub> ))] ( <b>71a</b> )	Zuordnung
11.26 (s)	12.1 (b)	N <sup>1</sup> -H
8.67 (s)	8.79 (s)	2-N=CH-NMe <sub>2</sub>
8.38 (s)	8.42 (s)	(Et <sub>3</sub> N) <sub>2</sub> H <sup>+</sup> <sup>17</sup>
7.99 (s)	9.34 (s)	H-8
7.48-6.85 (m)	7.48-6.92 (m)	Trityl
6.42 (d,d)	6.47 (d,d)	H-1'
5.59 (b)	5.94 (b)	3'-OH
4.61 (m)	4.64 (m)	H-3'
-	4.37 (s)	Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
4.10 (m)	4.10 (m)	H-4'
3.80 (s)	3.82 (s)	CH <sub>3</sub> O
3.39-3.25 (m)	3.49 (m)	H-5', H-5''
2.86-2.78 (m), 2.49-2.41 (m)	2.54-2.46 (m)	H-2', H-2''

Obwohl eine Platinierung an der N<sup>7</sup> - Position zu einer Tieffeldverschiebung von H-8 führt, ist eine derart starke Verschiebung durch eine Platinierung an N<sup>7</sup> nicht zu erklären. Vielmehr wird klar, daß die N<sup>7</sup> - Position protoniert ist. Aus der Literatur ist bekannt, daß H-8 bei Protonierung von N<sup>7</sup> stark tieffeldverschoben wird [78]. Diese Tieffeldverschiebung wird bei unplatiniertem 2'-Desoxyguanosin etwa bei pH-Werten kleiner 3 beobachtet ( $\text{pK}_{\text{a}}(\text{N}^7\text{-H}^+\text{-dGua}) = 2.4$ ,  $\text{pK}_{\text{a}}(\text{N}^1\text{-H-dGua}) = 9.33$ , [34]). Durch die Platinierung an der N<sup>1</sup> - Position erhöht sich dieser Wert deutlich, für das Protonierungsgleichgewicht von  $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{a}_3(\text{N}^1\text{-9-EtG-H})]^+$  (a = NH<sub>3</sub> o.ä.) wird ein Wert von  $\text{pK}_{\text{a}} = 4.5$  angegeben [11]. Folglich sollte dieser Effekt hier etwa bei pH-Werten kleiner 5 zu beobachten sein. Die wäßrige Lösung von **71a** (ca. 10<sup>-3</sup> M, 22°C) hat einen pH-Wert von pH = 4.9, dies bestätigt die getroffene Vermutung. Ein weiteres Argument, das deutlich gegen eine Platinierung an der N<sup>7</sup> - Position steht, ist die Abwesenheit von Signalen, die auf eine Kopplung von <sup>195</sup>Pt mit H-8 schließen lassen (Satelliten). Nach Literaturangaben ist eine Kopplungskonstante im Bereich von 21-25 Hz zu erwarten [79][80]. Die beobachtete starke Tieffeldverschiebung von H-8 gegenüber der unplatinierten Verbindung wird durch eine deutliche Tieffeldverschiebung von C-8 von 137.09 ppm auf 142.47 ppm bestätigt (Tabelle 6).

<sup>17</sup> Zuordnung unsicher

Tabelle 6: Chemische Verschiebungen  $\delta$  (ppm) der  $^{13}\text{C}$  - Atome von  $\text{O}^5$ -DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-dGua (**68**) und *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5</sup>-DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) in DMF-d<sub>7</sub>

$\text{O}^5$ -DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-dGua ( <b>68</b> )	<i>trans</i> -[Pt <sup>II</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl(N <sup>1</sup> -(O <sup>5</sup> -DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-dGua <sub>H</sub> ))] ( <b>71a</b> )	Zuordnung
158.81	159.46	N=CH-NMe <sub>2</sub>
41.06, 34.68	41.20, 34.98	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
158.32	159.12	C-2
150.76	149.74	C-4
121.11	117.41	C-5
158.55	157.20	C-6
137.09	142.47	C-8
83.74	84.45	C-1'
40.46	39.87	C-2'
72.07	71.46	C-3'
87.03	87.19	C-4'
65.33	65.17	C-5'
159.23, 159.20, 145.96, 136.64, 130.68, 130.60, 128.71, 128.42, 127.34, 113.70, 86.60	159.03, 158.99, 145.81, 136.55, 136.38, 130.55, 130.39, 128.57, 128.27, 127.19, 113.56, 86.51	Trityl
55.51	55.38	CH <sub>3</sub> O

Weiterhin ist aus Tabelle 6 ersichtlich, daß C-2 um 0.8 ppm tieffeldverschoben, C-4 dagegen um etwa 1 ppm wie auch alle weiteren Kohlenstoffatome des Pyrimidinringes (abgesehen von C-2) hochfeldverschoben ist. C-5 ist mit 3.7 ppm am stärksten hochfeldverschoben, aber auch C-6 ist um 1.3 ppm hochfeldverschoben. Dies kann nur durch eine Erhöhung der Elektronendichte im Pyrimidinring des Purins erklärt werden. Eine Deprotonierung von N<sup>1</sup>-H (unter der Annahme, daß die Platinierung nicht an N<sup>1</sup>, sondern an N<sup>7</sup> erfolgt ist) unter den Bedingungen der NMR - Messung (saure Lösung) ist nicht anzunehmen ( $\text{pK}_{[\text{Pt}^{\text{II}}\text{a}_3(\text{N}^7\text{-9-EtG})]^+} = 8.3$ ,  $\text{a} = \text{NH}_3$  o.ä. [11]). Hinzu kommt, daß O<sup>5</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (**68**) Triethylamin enthält und N<sup>1</sup>-H dem <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum nach zu urteilen bereits teilweise deprotoniert ist (Abb. 105a). Die unterschiedlichen Aciditäten der Lösungen von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5</sup>-DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) und O<sup>5</sup>-DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-dGua (**68**) sind prinzipiell auch an den chemischen Verschiebungen  $\delta$  der Methylengruppen des anwesenden Triethylamins erkennbar ( $\delta = 2.74$  bei **68**,  $\delta = 3.11$  bei **71a**, beide Werte in DMF-d<sub>7</sub>). Die teilweise Deprotonierung von **68** ist auch theoretisch zu erwarten, wenn man die  $\text{pK}_a$  - Werte von 2'-Desoxyguanosin (**30**) ( $\text{pK}_{(\text{N}^7\text{-H}^+-\text{dGua})} = 2.4$ ,  $\text{pK}_{(\text{N}^1\text{-H-dGua})} = 9.33$ , [34]) mit dem des protonierten Triethylamins vergleicht ( $\text{pK}_b$  von Triethylamin: 3.25 [75]  $\rightarrow$   $\text{pK}_a = 10.75$ ). Daher können die beobachteten

Hochfeldverschiebungen fast aller Kohlenstoffatome im Pyrimidinring des Purins infolge Platinierung nur durch einen Austausch von N<sup>1</sup>-H gegen eine elektronenschiebende Gruppe erklärt werden, dies ist bei einer Platinierung so. Auf die Anwesenheit von Platin kann aus dem vorliegenden NMR - Spektrum indirekt durch das Vorhandensein der Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> - Protonen geschlossen werden. Bestätigt wird die gelungene Platinierungssynthese durch die mit Hilfe von MALDI ermittelte Molmasse. Diese wurde ohne Matrix gemessen. Die theoretische Molmasse von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**) beträgt m/z = 889.3, es wurde eine Molmasse von m/z = 891.0 ermittelt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Theoretische und mit Hilfe von MALDI ermittelte Molmassen von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] (**71a**)

gefunden [m/z]	theoretisch [m/z]	Zuordnung
891.0	889.3	MH <sup>+</sup>
665.1	663.8	MH <sup>+</sup> - {Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl} <sup>+</sup> + K <sup>+</sup>
649.2	647.7	MH <sup>+</sup> - {Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl} <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup>
471.7	475.2	M + K <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup>
454.8	456.1	MH <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup>

Weiterhin treten die Natrium- und Kaliumaddukte der deplatinierten Verbindung sowie zwei Massenpeaks auf, die den zweifach geladenen Ionen aus Molpeak plus Na<sup>+</sup> bzw. plus Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> zugeordnet werden können (Tabelle 7).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es gelungen ist, *trans*-Diamminchloro-N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylato)-platin(II) (**71a**) zu synthetisieren. Dabei wurde das bereits zur Synthese des platinieren Synthesebausteines „Pt-T“ (**29**) angewendete Syntheseverfahren der direkten Platinierung in DMF angewendet. Die Struktur wurde durch umfangreiche NMR - spektroskopische Untersuchungen bestätigt. Die Molmasse konnte durch MALDI bestätigt werden. Die durchgeführte Platinierungsreaktion sollte sich auf das entsprechende H-Phosphonat übertragen lassen. Dies konnte jedoch nicht mehr durchgeführt werden. Weiterhin ist es denkbar, daß die durchgeführte Platinierung von Kalium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylat (**70**) auch mit einem vergleichbaren Derivat, das eine kleinere Schutzgruppe als die verwendete Dimethylaminomethylen - Schutzgruppe an der N<sup>2</sup> - Position trägt, in analoger Weise durchführbar ist. Die als Hauptursache für die relativ geringe Ausbeute angesehene sterische Hinderung durch die Dimethylaminomethylen - Schutzgruppe würde wegfallen und eine höhere Produktausbeute wäre zu erwarten.

Nach erfolgreicher Platinierung von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin an der N<sup>1</sup> - Position erfolgten keine weiteren Versuche zur Synthese des N<sup>7</sup>-plattinierten Isomeren. Die Platinierung selbst sollte in wäßriger Lösung bei einem pH - Wert von 5 durchführbar sein, ohne daß dabei eine Detritylierung in relevanter Größenordnung abläuft.



## 10 Präparativer Teil

### 10.1 Chemikalien

#### Labor- und Feinchemikalien

Acetonitril (extra dry) für die Synthesen	Pharmacia
Acetonitril (> 99.8 %) für die iHPLC	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (Acrylamide - Bis Premix 5 % C)	Serva
1-Adamantanoylchlorid (99 %)	Lancaster
Ammoniumacetat (> 99.5 %)	Fluka
Bernsteinsäureanhydrid (> 99 %)	Merck
Capping I	Pharmacia
Capping II	Pharmacia
2,4,6-Collidin (zur Synthese)	Merck
Chlor-2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit	Sigma
O <sup>6</sup> -Cyanoethyl-O <sup>5'</sup> -dimethoxytrityl-	
N <sup>2</sup> -(4-isopropyl)phenoxyacetyl-2'-desoxyguanosin-	
3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit	Pharmacia
2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit	Sigma
DBUH <sup>+</sup> N <sup>6</sup> -benzoyl-O <sup>5'</sup> -dimethoxytrityl-	
2'-desoxyadenosin-3'-H-phosphonat	Millipore
DBUH <sup>+</sup> N <sup>4</sup> -benzoyl-O <sup>5'</sup> -dimethoxytrityl-	
2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat	Millipore
DBUH <sup>+</sup> O <sup>5'</sup> -dimethoxytrityl-N <sup>2</sup> -isobutyryl-	
2'-desoxyguanosin-3'-H-phosphonat	Millipore
DBUH <sup>+</sup> O <sup>5'</sup> -dimethoxytrityl-thymidin-	
3'-H-phosphonat	Millipore
2'-Desoxyadenosin (~ 99 %)	Fluka
2'-Desoxycytidin-hydrochlorid (> 99 %)	Merck
2'-Desoxyguanosin - Monohydrat (> 98 %)	Fluka
Detritylation 0.2 µmol	Pharmacia
<i>trans</i> -Diammindichloroplatin(II) (99.95 %)	PGM Chemicals (Pty) Ltd
<i>trans</i> -Diammin-N-(2-Aminoethanol)-	
N <sup>3</sup> -(1-Methylthyminato)platin(II)-chlorid - Dihydrat	U. Berghoff, Uni Dortmund
Dichlorethan	Pharmacia
N,N-Diethylanilin (> 99.5 %)	Fluka

Dimethoxytritylchlorid (98 %)	Lancaster
O <sup>5'</sup> -Dimethoxytrityl-N <sup>6</sup> -phenoxyacetyl-2'-desoxyadenosin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit	Pharmacia
O <sup>5'</sup> -Dimethoxytrityl-N <sup>4</sup> -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit	Pharmacia
O <sup>5'</sup> -Dimethoxytrityl-thymidin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit	Pharmacia
4-N,N-Dimethylaminopyridin (> 99 %)	Merck
Dimethylformamid (> 99.5 %)	Fluka
Dimethylformamid-dimethylacetal (90-95 %)	Fluka
Dioxan (> 99.5 %)	Fluka
Essigsäure (> 99.8 %)	Merck
Harnstoff (ultra pure)	USB
Hydrolink Long Ranger Gel Solution (50 %)	AT Biochem
Isobuttersäureanhydrid (> 98 %)	Merck
Kaliumchlorid (> 99.5 %)	Fluka
Kaliumhydroxid (99.99 %, enthält 10 - 15 % Wasser)	Aldrich
Long Chain Alkylamine Controlled Pore Glas	Sigma
2,6-Lutidin (> 98 %)	Sigma
Methanol (> 99.8 %)	Merck
N-Methylmorpholin (> 99.5 %)	Fluka
Molekularsieb 4 Å	Merck
Natriumacetat (> 99.5 %)	Fluka
Natriumbromid	GERMED
Natriumchlorid (≥ 99.5 %)	Sigma
Neutralrot	Feinchemie KG Sebnitz
Oxidation	Pharmacia
Phosphortrichlorid (zur Synthese)	Merck
Pivaloylchlorid (> 98 %)	Fluka
Primer Support dA	Pharmacia
Primer Support dG	Pharmacia
Primer Support PAC-dA 0.2 µmol	Pharmacia
Primer Support PAC-dG 0.2 µmol	Pharmacia
Primer Support T	Pharmacia
Pyridin (> 99.5 %)	Ferak und Merck
Salicylsäure (zur Synthese)	Merck
Salzsäure, TESTAL	VEB Arzneimittelwerk Dresden
Sephadex G-10	Pharmacia
Sephadex G-25	Pharmacia

TBTU	Nova Biochem
1H-Tetrazol	Pharmacia
Thymidin (99-100 %)	Sigma
Triethylamin ( $\geq 99.5\%$ )	Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Reagent Grade)	Sigma
Zinn(II)-chlorid (rein)	VEB Berlin-Chemie

Das verwendete Collidin wurde über KOH getrocknet und bei 7 Torr im Bereich von 68.5 - 69°C abdestilliert, das verwendete N,N-Diethylanilin wurde gleichfalls über KOH getrocknet und bei 9 mbar und 51.5°C abdestilliert. Pyridin, 2,6-Lutidin, Collidin und Acetonitril wurden über Molekularsieb getrocknet bzw. gelagert. Triethylamin wurde über KOH getrocknet und destilliert (89°C).

### Enzyme und Ergänzungsmittel

T4 DNA Ligase	MBI
Ligase - Puffer	GibcoBRL
T7 DNA Polymerase	Pharmacia
AutoRead Sequencing Kit	Pharmacia
alkalische Phosphatase (für die Molekularbiologie)	Boehringer
Phosphodiesterase I (aus Schlangengift)	Merck

### Trennmaterialien

Dünnschichtchromatographie	DC - Fertigplatten, Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , Schichtdicke 0.25 mm (Merck)
Dickschichtchromatographie	DC - Fertigplatten, Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , Schichtdicke 2 mm (Merck)
Säulenchromatographie	Kieselgel 60, Korngröße 0.063 - 0.63 mm (Merck) Kieselgel 60 silanisiert, Korngröße 0.063 - 0.20 mm (Merck)
Flash - Chromatographie	Kieselgel 60, Korngröße 0.04 - 0.063 mm (Merck)

**HPLC - Säulen**

präparative RP-HPLC	HPLC - Säule (120 × 16 mm), gefüllt mit Nucleosil 100 C18 7 µm
analytische RP-HPLC	HPLC - Säule (125 × 4 mm), gefüllt mit Nucleosil 100 C18 5 µm
iHPLC	HPLC - Säule (125 × 4 mm), gefüllt mit Nucleogen DEAE 60-7

## 10.2 Geräte

HPLC - Anlagen	Shimadzu: Controller SLC-6B, Integrator C-R4A, Autoinjektor SIL-9A, Säulenofen CTO-6A, Pumpen LC-6A, UV-Detektor SPD-6AV  Gamma Analysen Technik: Pumpen LC 1110 und LC 1500, System Organizer LC 1431, UV-Detektoren GAT-PHD 601 und GATZ LCD 502
Chromatographiesäule	Glassäule (Länge: 150 mm, Ø 20 mm)
Chromatographieanlage	Pharmacia LKB · Uvicord SII, Pharmacia LKB · Redi Frac, Pharmacia LKB · REC 101 (Pharmacia)
Flash - Chromatographie	Glasgerätebau Ochs GmbH, Glassäule (Länge: 500 mm, Ø 20 mm)
pH - Meter	Digital pH Meter 646 (Knick)
Pipetten	Pipetman 2, 20, 200, 1000 und 5000 µl (Gilson)
$^1\text{H}$ -, $^{13}\text{C}$ -, $^{31}\text{P}$ -NMR - Spektroskopie	AM 300 (Bruker Physics AG, USA), deuteriertes Lösungsmittel als interner Standard (für $^1\text{H}$ -, $^{13}\text{C}$ -NMR: gegen TMS, für $^{31}\text{P}$ -NMR: gegen 85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$ )
$^{195}\text{Pt}$ -NMR - Spektroskopie	AC 200 (Bruker Physics AG, USA), $\text{K}_2[\text{PtCl}_6]$ als externer Standard
Ionenspray - MS:	TSQ 700 (Finnigan MAT)
MALDI - MS:	LAMMA- und MAUSY-System (Institut für med. Physik und Biophysik Münster)  Laser Tec - Benchtop II System (PerSeptive Biosystems)
UV - Spektroskopie	Spekord UV 160 A, UV - visible recording spektrophotometer (Shimadzu, Japan)  CARY 1, UV - visible spektrophotometer, temperatur controller (Varian Australien)

IR - Spektroskopie	1650 FTIR (Perkin Elmer) IFS 55 (Bruker)
Wasserreinigung	Milli-Q (Millipore)
Tischzentrifuge	Biofuge 13 (Heraeus)
DNA - Sequenzierung	A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia)
DNA - Synthesizer	Gene - Assembler Special (Pharmacia)
Vakuumrotationsverdampfer	Rotavapor RE 111 (BÜCHI, Switzerland)
Lyophile	CHRIST LOC-1m ALPHA 2-4
Ölpumpe	Vacuubrand
Potentiostaten	Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech) Generateur pour Electrophorese (APELAX, France)
Thermostat	thermo - DUX, Techne DRI - BLOCK DB · 3 (Gesellschaft für Laborgeräte mbH)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKAMAG RET, IKA-Labortechnik (Janke & Kunkel GmbH & Co KG)
UV - Lampe	SVL, BIOBLOCK SCIENTIFIC (ILLKIRCH CEDEX, France)
Waagen	Petit Balance (Ohyo Balance Corp. Kyoto, Japan) R 200 D (Sartorius)

### 10.3 Synthesevorschriften

#### Salicyloylchlorophosphit (49)

Das verwendete Salicyloylchlorophosphit wurde nach der bei *Young* beschriebenen Methode hergestellt [81]. Zu 27.6 g (0.2 mol) Salicylsäure wurden 30 ml Toluol zugegeben, anschließend unter Rühren 19.2 ml (0.22 mol)  $\text{PCl}_3$  zugetropft. In einer Stickstoffatmosphäre wurde 3 Stunden am Rückfluß kochen gelassen, dann das Toluol im Vakuum abdestilliert. Im Bereich von 77-87°C bei 1-2 Torr geht Salicyloylchlorophosphit als farblose Flüssigkeit über. Ein Vorlauf wurde abgenommen und verworfen, gegen Ende der Hauptfraktion wurde die Vakuumdestillation abgebrochen.

isolierte Ausbeute: 20.3 g Salicyloylchlorophosphit (50 % Ausbeute)

#### N<sup>6</sup>-Isobutyryl-2'-desoxyadenosin (72)

1.88 g (7 mmol) 2'-Desoxyadenosin wurden analog der Synthese von N<sup>4</sup>-Isobutyryl-2'-desoxycytidin (75) isobutyryliert. Anstelle der Extraktion wurde jedoch eine säulenchromatographische Reinigung mittels Flashchromatographie (Kieselgel, Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$ ) durchgeführt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, einrotiert, in Aceton gelöst und erneut einrotiert. Der erhaltene Feststoff wurde im Vakuum über KOH getrocknet.

isolierte Ausbeute: 1.99 g N<sup>6</sup>-iBu-dAd (ca. 89 % Ausbeute)

Analysen: DC:  $R_f = 0.25$  (Kieselgel, Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$ )

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 10.64$  ppm [s, 1H, 6-NH], 8.66 [s, 1H, H-2 oder H-8], 8.65 [s, 1H, H-2 oder H-8], 6.46 [dd, 1H, H-1'], 5.37 [d, J = 4.05 Hz, 1H, 3'-OH], 5.03 [t, J = 5.52 Hz, 1H, 5'-OH], 4.48-4.42 [m, 1H, H-3'], 3.92-3.88 [m, 1H, H-4'], 3.67-3.50 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.97 [h, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-], 2.82-2.74 [m, 1H, H-2'], 2.38-2.31 [m, 1H, H-2''], 1.13 [d, J = 6.60, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-]

### **O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>6</sup>-isobutyryl-2'-desoxyadenosin (73)**

Die Synthese erfolgte nach der Prozedur von *Jones* [52]. 1.09 g (3.4 mmol) N<sup>6</sup>-Isobutyryl-2'-desoxyadenosin (**72**) wurden mit Pyridin codestilliert, in 30-50 ml Pyridin gelöst, 20 mg (0.05 eq) 4-N,N-Dimethylaminopyridin, 646  $\mu$ l (1.4 eq) Triethylamin und 2 g (1.7 eq) Dimethoxytritylchlorid zugegeben und 1.5 Stunden reagieren lassen. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel im Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 verfolgt. Nun wurden 25 ml Wasser zugegeben, dreimal mit Ether extrahiert, die Reaktionsmischung einrotiert und mit Wasser codestilliert. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit Hilfe von Flashchromatographie an Kieselgel in CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 99/1 unter Zusatz von 0.5 % Triethylamin gereinigt. Im Verlauf der chromatographischen Reinigung wurde der Gehalt an Methanol schrittweise auf 4 % erhöht. Nach Einrotieren der gesammelten Fraktionen wurden 1.45 g O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>6</sup>-iBu-2'-desoxyadenosin erhalten.

isolierte Ausbeute: 1.45 g O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>6</sup>-iBu-dAde (ca. 69 % Ausbeute)

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.59 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 10.66 ppm [s, 1H, 6-NH], 8.57 [s, 2H, H-2 und H-8], 7.34-6.76 [m, 13H, DMTr], 6.48 [dd, 1H, H-1'], 5.44 [d, J = 4.41 Hz, 1H, 3'-OH], 4.53 [m, 1H, H-3'], 4.03 [m, 1H, H-4'], 3.72 [s, 3H, CH<sub>3</sub>O], 3.71 [s, 3H, CH<sub>3</sub>O], 3.19 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.03-2.91 [m, 2H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH- und H-2'], 2.46 [q, J = 7.35 Hz, ~1.5H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N], 2.45-2.36 [m, 1H, H-2''], 1.13 [d, J = 6.63 Hz, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-], 0.94 [t, J = 7.35 Hz, ~2.5H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N]

### **Triethylammonium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>6</sup>-isobutyryl-2'-desoxyadenosin-3'-H-phosphonat (74)**

796.3 mg (1.28 mmol) O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>6</sup>-iBu-2'-desoxyadenosin (**73**) wurden zweimal mit Dioxan codestilliert, in 5 ml Dioxan gelöst, 1.92 ml (13.6 eq) N-Methylmorpholin zugegeben und auf ca. 12°C gekühlt. Nun wurden unter heftigem Rühren 407 mg (1.6 eq) Salicyloylchlorophosphit (**49**) zugegeben. Nach einer Stunde Reaktion wurden 1.9 ml Wasser zugegeben, nach Reaktion über weitere 30-40 min einrotiert, am Ende im Vakuum einer Ölpumpe. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und zweimal mit einer frisch gesättigten wäßrigen Lösung von Natriumhydrogenkarbonat extrahiert, anschließend zweimal



mit einer 0.5 M wäßrigen Lösung von Triethylammoniumhydrogenkarbonat extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Nach Zugabe von 25 ml Ether und 25 ml Hexan wurde 3 Tage bei Raumtemperatur rühren gelassen, anschließend abgesaugt. Dabei wurden 840 mg  $O^{5'}$ -DMTr- $N^6$ -iBu-2'-desoxyadenosin-3'-H-phosphonat als Triethylammoniumsalz erhalten.

isolierte Ausbeute: 840 mg TEAH<sup>+</sup>  $O^{5'}$ -DMTr- $N^6$ -iBu-dAde-3'-H-phosphonat  
(ca. 83 % Ausbeute)

Analysen: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 10.66 ppm [s, 2H, 6-NH und  $(CH_3-CH_2)_3NH^+$ ], 8.55 [s, 1H, H-2 oder H-8], 8.53 [s, 1H, H-2 oder H-8], 7.34-6.76 [m, 13H, DMTr], 6.66 [d,  $J$  = 586.06 Hz, 1H,  $H-P$ ], 6.47 [dd, 1H, H-1'], 4.86 [m, 1H, H-3'], 4.21 [m, 1H, H-4'], 3.72 [s, 3H,  $CH_3O$ ], 3.71 [s, 3H,  $CH_3O$ ], 3.27-3.18 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.07-2.93 [m, 2H,  $(CH_3)_2CH-$  und H-2'], 3.01 [q,  $J$  = 7.35, 6H,  $(CH_3-CH_2)_3NH^+$ ], 2.55 [m, 1H, H-2''], 1.16 [t,  $J$  = 7.35 Hz, 9H,  $(CH_3-CH_2)_3NH^+$ ], 1.13 [d,  $J$  = 6.60 Hz, 6H,  $(CH_3)_2CH-$ ]

#### **$N^4$ -Isobutyryl-2'-desoxycytidin (75)**

Die Synthese erfolgte nach der Prozedur von Jones [52]. 2.64 g (10 mmol) 2'-Desoxycytidinhydrochlorid wurden zweimal mit wenig trockenem Pyridin codestilliert, in 60 ml trockenem Pyridin suspendiert und unter Rühren langsam 6.5 ml (50 mmol) Trimethylsilylchlorid zugetropft. Nach 2.5 Stunden wurden 8.5 ml (50 mmol) Isobuttersäureanhydrid zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit Eis abgekühlt und 20 ml Wasser zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten wurden 20 ml konz. Ammoniaklösung zugegeben und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nun wurde das Reaktionsgemisch einrotiert, mehrmals mit Wasser codestilliert und schließlich in 50 ml Wasser gelöst. Die wäßrige Phase wurde fünfmal mit Ether extrahiert, die vereinigten Etherphasen einmal mit Wasser reextrahiert, diese Phase erneut einmal mit Ether extrahiert und mit der anderen wäßrigen Phase vereinigt. Die wäßrige Phase wurde einige Zeit bei Raumtemperatur stehen gelassen, daraufhin über Nacht bzw. für einen Tag im Kühlschrank auskristallisieren lassen. Nach Absaugen des ausgefallenen Niederschlags und Trocknen im Exsiccator über  $CaCl_2$  wurden 2.40 g  $N^4$ -Isobutyryl-2'-desoxycytidin erhalten.

isolierte Ausbeute: 2.40 g  $N^4$ -Isobutyryl-2'-desoxycytidin · 1.2 H<sub>2</sub>O (75 % Ausbeute)

Analysen:	CHN:	berechnet:	C:48.96	H:6.73	N:13.18
		gefunden:	C:49.03	H:6.68	N:13.36

DC:  $R_f = 0.21$  (Kieselgel, Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$  (+ 0.5 % TEA))

### **O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin (76)**

Der Schutz der 5'-Hydroxygruppe als Dimethoxytritylether erfolgte nach der Prozedur von Jones [52]. 615 mg (1.93 mmol) N<sup>4</sup>-Isobutyryl-2'-desoxycytidin · 1.2 H<sub>2</sub>O (**75**) wurden mit Pyridin codestilliert, in 25 ml Pyridin gelöst und 12 mg (0.05 eq) 4-N,N-Dimethylaminopyridin, 400 µl (1.4 eq) Triethylamin sowie 800 mg (1.2 eq) Dimethoxytritylchlorid zugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel im Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$  verfolgt. Nach 2-3 Stunden wurden 25 ml Wasser zugegeben, dreimal mit Ether extrahiert, die Reaktionsmischung einrotiert und mit Wasser codestilliert. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit Hilfe von Flashchromatographie an Kieselgel in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 99/1$  unter Zusatz von 0.2 % Triethylamin gereinigt. Nach Einrotieren der gesammelten Fraktionen wurden 1.20 g O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin erhalten.

isolierte Ausbeute: 1.20 g O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>4</sup>-iBu-2'-desoxycytidin (ca. 96 % Ausbeute)

Analysen: DC:  $R_f = 0.43$  (Kieselgel, Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$  (+ 0.5 % TEA))

### **Triethylammonium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat (77)**

Die Phosphonylierung erfolgte nach der Vorschrift von Marugg *et al.* [59] unter Verwendung von N-Methylmorpholin als Base. 3 g (5 mmol) O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin (**76**) wurden zweimal mit trockenem Dioxan codestilliert, dann in 20 ml Dioxan gelöst. Mit Eis wird die Lösung auf etwa 12°C gekühlt und unter kräftigem Schütteln eine Lösung von 1.59 g (7.85 mmol) Salicyloylchlorophosphit (**49**) in 7.5 ml Dioxan zugegeben. Nach 15-20 Minuten wurden 7.5 ml Wasser zugegeben und 30 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung mit einem Vakuumrotationsverdampfer zum Öl eingeeengt, in 150 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit einer frisch gesättigten wässrigen Lösung von Natriumhydrogenkarbonat extrahiert, die vereinigten wässrigen Phasen mit wenig Chloroform reextrahiert, nun die vereinigten organischen Phasen zweimal mit einer 0.5 M wässrigen Lösung von Triethylammoniumhydrogenkarbonat extrahiert und diese beiden wässrigen Phasen gleichfalls vereinigt und mit wenig Chloroform reextrahiert. Die

organischen Phasen wurden vereinigt, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Dabei wurden 3.66 g Triethylammonium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat als Rohprodukt erhalten.

Eine weitere Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1 unter Zusatz von 1 % Triethylamin. Von 2 g des zuvor erhaltenen Rohproduktes wurden 1.89 g Triethylammonium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat isoliert.

isolierte Ausbeute: 1.89 g TEAH<sup>+</sup> O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>4</sup>-iBu-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat  
(ca. 90 % Ausbeute)

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.36 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10.88 ppm [s, 1H, 6-NH], 8.13 [d, J = 7.53 Hz, 1H, H-6], 7.38-6.88 [m, 13H, DMTr], 7.09 [d, J = 7.54 Hz, 1H, H-5], 6.61 [d, J = 598.67 Hz, 1H, H-P], 6.11 [dd, 1H, H-1'], 4.71 [m, 1H, H-3'], 4.13 [m, 1H, H-4'], 3.74 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.28 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.92 [q, J = 7.16 Hz, 6H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>], 2.72 [h, J = 6.78 Hz, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-], 2.28 [m, 2H, H-2' und H-2''], 1.13 [t, J = 7.16 Hz, 9H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>], 1.06 [d, J = 6.41 Hz, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-]

### Kaliumthymidylat (78)

1.056 g (4.36 mmol) Thymidin wurden in wenig Wasser, das zuvor mit Helium gespült wurde, suspendiert, 4.415 ml (1 eq) einer 0.9875 M KOH - Lösung zugegeben und gerührt, bis sich alles Thymidin gelöst hatte, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. 865.7 mg Produkt wurden als kristalliner Feststoff erhalten, der restliche Teil war nicht kristallin wurde daher nicht isoliert.

isolierte Ausbeute: 865.7 mg (2.82 mmol) KThyd<sub>H</sub> · 1.5 H<sub>2</sub>O (65 % Ausbeute)

Analysen:	CHN:	berechnet:	C:39.08	H:5.25	N:9.12
		gefunden:	C:39.08	H:5.35	N:9.26

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ = 7.39 ppm [s, 1H, H-6], 6.23 [t, J = 6.78 Hz, 1H, H-1'], 4.37-4.32 [m, 1H, H-3'], 3.91-3.87 [m, 1H, H-4'], 3.76-3.62 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.24-2.20 [m, 2H, H-2' und H-2''], 1.76 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

***trans*-Diamminchlorothymidylatoplatin(II) (61a)**

57 mg (186  $\mu$ mol) KThyd.<sub>H</sub> · 1.5 H<sub>2</sub>O (**78**) wurden mit 55.7 mg (1 eq) *trans*-Platin (**1a**) in 1 ml DMF für einen Tag bei 60°C und einen weiteren Tag bei Raumtemperatur unter Abschirmung von Licht umgesetzt, anschließend das DMF im Vakuum einer Ölpumpe abrotiert, 20 ml Methanol zugegeben, 2 Tage gerührt und schließlich abgesaugt.

isolierte Ausbeute: 64.8 mg *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(Thyd.<sub>H</sub>)]

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.04 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 7.85 ppm [s, ~0.2H, HCON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 7.40 [s, 1H, H-6], 6.25 [t, J = 6.78 Hz, 1H, H-1'], 4.37 [m, 1H, H-3'], 3.92 [m, 1H, H-4'], 3.78-3.64 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.45 [s(b), Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 3.26 [s, 1H, CH<sub>3</sub>OH], 2.93 [s, ~0.6H, HCON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.77 [s, ~0.6H, HCON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.28-2.24 [m, 2H, H-2' und H-2''], 1.79 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

**O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin (40)**

Die Synthese erfolgte analog der Dimethoxytritylierung von N<sup>4</sup>-Isobutyryl-2'-desoxycytidin (**75**) nach der Prozedur von Jones [52]. 2.53g (10.4 mmol) Thymidin wurden zweimal mit Pyridin codestilliert und in 100 ml Pyridin mit 61 mg (0.05 eq) 4-Dimethylaminopyridin, 1.9 ml (1.4 eq) Triethylamin und 4.2g (1.2eq) Dimethoxytritylchlorid umgesetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel im Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 verfolgt. Nach 3-4 Stunden wurden 80 ml Wasser zugegeben, dreimal mit Ether extrahiert, die Reaktionsmischung einrotiert und dreimal mit Wasser codestilliert. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit Hilfe von Flashchromatographie an Kieselgel in Chloroform mit einem Gradienten von 2 - 2.5 % Methanol unter Zusatz von 0.1 % Triethylamin gereinigt. Nach Einrotieren der gesammelten Fraktionen wurden 4.93 g O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin erhalten.

isolierte Ausbeute: 4.93 g O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd (ca. 87 % Ausbeute)

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.42 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 (+ 0.5 % TEA))

### Kalium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-thymidylat (41)

2.18 g (4 mmol) O<sup>5'</sup>-DMTr-Thymidin (**40**) wurden mit 4.255 ml 0.94 M KOH - Lösung (1 eq) versetzt, 15 ml mit Helium gespültes Wasser zugegeben und gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

isolierte Ausbeute: 2.25 g K(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>) · 1.25 H<sub>2</sub>O (93 % Ausbeute)

Analysen:	CHN:	berechnet:	C:61.52	H:5.58	N:4.63
		gefunden:	C:61.46	H:5.66	N:4.61

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.41-6.88 ppm [m, 13H, DMTr], 7.32<sup>18</sup> [s, 1H, H-6], 6.28 [dd, 1H, H-1'], 4.28 [m, 1H, H-3'], 3.84 [m, 1H, H-4'], 3.73 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.16 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.19-2.02 [m, 2H, H-2' und H-2''], 1.43 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

### *trans*-Diamminchloro-N<sup>3</sup>-(O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-thymidylato)-platin(II) (34a)

89.5 mg (0.3 mmol) *trans*-Platin (**1a**) wurden mit 173.8 mg (1 eq) K(O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-thymidylat) · 1.25 H<sub>2</sub>O (**41**) in 1 ml DMF unter Abschirmung von Licht für 8 Stunden bei 50-60°C und 2 Tage bei Raumtemperatur umgesetzt, anschließend das DMF mit einem Vakuumrotationsverdampfer im Ölpumpenvakuum abrotiert und das Produkt chromatographisch an silanisiertem Kieselgel im Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 99.5/0.5 (+ 0.2 % TEA) gereinigt.

isolierte Ausbeute: 210.7 mg *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>3</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>))] · x DMF · y KCl · z H<sub>2</sub>O (ca. 80 % Ausbeute)

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.23 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR<sup>19</sup>(DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.94 ppm [s, ~1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N-CH=O], 7.41-6.87 [m, 14H, H-6 und DMTr], 6.26 [dd, 1H, H-1'], 5.37 [d, J = 3.80 Hz, 1H, 3'-OH],

---

<sup>18</sup> ermittelt durch <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY

<sup>19</sup> Der Chloroligand am Platinatom hat mutmaßlich vollständig gegen DMSO-d<sub>6</sub> ausgetauscht.

4.30<sup>19</sup> [s(b), Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und H-3'], 3.87 [m, 1H, H-4'], 3.72 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.57 [s(b), ~1H], 3.32 [s, ~1.5H, CH<sub>3</sub>OH], 3.21-3.15 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.87 [s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N-CH=O], 2.71 [s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N-CH=O], 2.16-2.06 [m, 2H, H-2' und H-2''], 1.41 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

### Phosphitylierung von *trans*-Diamminchloro-N<sup>3</sup>-(O<sup>5</sup>-dimethoxytrityl-thymidylato)-platin(II)

Analog der Vorschrift von *Atkinson* zur Phosphitylierung von Nucleosiden [55] wurden 39.6 mg (ca. 45 µmol) *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**34a**) mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Py = 9/1 codestilliert, unter Argon 27.1 µl (4 eq) TEA, 300 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 14.1 µl (1.3 eq) Chlor-2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (**42**) hinzugefügt und unter Rühren 10 min reagieren lassen. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/iPrOH = 95/5 (+ 1 % TEA)) verfolgt. Nun wurde die Lösung auf eine präparative DC - Platte (2 mm) aufgetragen, im Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/iPrOH = 95/5 (+ 1 % TEA) aufgetrennt, die produktthaltige Fraktion Kieselgel abgetrennt und mit dem verwendeten Laufmittel herausgelöst. Nach Einrotieren der Lösung wurde der feste Rückstand in ca. 500 µl CDCl<sub>3</sub> gelöst, dem etwas TEA zugesetzt wurde, und die Lösung mit <sup>31</sup>P-NMR vermessen.

Analysen: HPTLC: R<sub>f</sub> = 0.23, 0.27 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/iPrOH = 95/5 (+ 1 % TEA))

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 149.50 ppm, 149.10, 14.88

### *trans*-Diammin-N-(aminoethyl-2-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit)-N<sup>3</sup>-(1-methylthyminato)-platin(II)-chlorid (**46**)

45 mg (90 µmol) *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N-(2-Aminoethanol)(1-MeT<sub>H</sub>)]Cl · 2 H<sub>2</sub>O (**45**) wurden mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Py = 9/1 codestilliert, in 54 µl (4 eq) TEA und 1 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in einer Argonatmosphäre suspendiert und unter Rühren mit 28 µl (1.3 eq) Chlor-2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (**42**) versetzt. Nach 1 h wurden weitere 1.3 eq Chlor-2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (**42**) hinzugefügt. Nach 20 Stunden wurde unter Argon abgesaugt, dabei wurden 62.4 mg Rohprodukt erhalten, die ohne weitere Reinigung für die Festphasensynthese eingesetzt wurden.

isolierte Ausbeute: 62.4 mg *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N-(aminoethyl-2-(2-CN-ethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit)-N<sup>3</sup>-(1-methylthyminato)]Cl (Rohprodukt)

### **O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin-3'-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (26d)**

Die Phosphitylierung von O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin (**40**) erfolgte nach der Synthese von *Barone et al.* [56] in Acetonitril. 1.63 g (3 mmol) O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin (**40**) wurden mit Acetonitril codestilliert, unter Argon mit 105.1 mg (0.5 eq, 1.5 mmol) 1H-Tetrazol versetzt und in 45 ml Acetonitril gelöst, nachfolgend wurden 1.02 ml (1.07 eq, 3.2 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropyl-phosphordiamidit zugegeben und über das Wochenende reagieren lassen. Nun wurden 6 ml TEA und 100 ml Essigester hinzugefügt, mit gesättigter NaCl - Lösung und halb gesättigter NaHCO<sub>3</sub> - Lösung extrahiert, die organische Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Produkt durch chromatographische Trennung an Kieselgel im Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH/TEA = 92/7/1 gereinigt.

isolierte Ausbeute: 1.31 g O<sup>5'</sup>-DMTr-thyd-3'-(2-CN-ethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (ca. 59 % Ausbeute)

Analysen: HPTLC: R<sub>f</sub> = 0.70, 0.74 (Kieselgel, Laufmittel: Essigester/iPrOH/H<sub>2</sub>O = 4/1/2 (Oberphase))

### **Natrium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-thymidin-3'-H-phosphonat (15d)**

Die Phosphonylierung erfolgte analog der Synthese von Triethylammonium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat (**77**). 4.93 g (9 mmol) O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-thymidin (**40**) wurden mit Dioxan codestilliert, in 20 ml Dioxan gelöst und 13.5 ml N-Methylmorpholin hinzugefügt. Nach Kühlen auf ca. 12°C wurde unter heftigem Rühren eine Lösung von 2.86 g (1.5 eq) Salicyloylchlorophosphit (**49**) in 10 ml Dioxan zugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1) verfolgt. Nach Abschluß der Reaktion erfolgte unter Rühren die Zugabe von 13.5 ml Wasser, nach 45 min wurde die Lösung an einem Vakuumrotationsverdampfer einrotiert, am Ende in einem Ölpumpenvakuum. Nun wurde der Rückstand zweimal mit Wasser codestilliert, in CHCl<sub>3</sub> aufgenommen und dreimal mit einem Gemisch aus gesättigter wäßriger NaHCO<sub>3</sub> - Lösung und gesättigter wäßriger NaCl - Lösung extrahiert. Anschließend wurde die CHCl<sub>3</sub> - Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, einrotiert, 70 ml Aceton zugefügt und unter

Rühren 10 h am Rückfluß gekocht, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und nachfolgend abgesaugt. Nach Trocknen im Vakuum in einem Exsiccator über KOH wurden 4.48 g Na-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat erhalten.

isolierte Ausbeute: 4.48 g Na-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat · 2 H<sub>2</sub>O · x  
CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (75 % Ausbeute)

Analysen:	CHN:	berechnet <sup>20</sup> :	C:55.83	H:5.52	N:4.16	P: 4.6
		berechnet <sup>21</sup> :	C:55.86	H:5.44	N:4.20	P: 4.6
		gefunden:	C:55.86	H:5.23	N:4.20	P: 4.5

DC: R<sub>f</sub> = 0.25 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 11.40 ppm [s, 1H, N<sup>3</sup>H], 7.51 [s, 1H, H-6], 7.40-6.88 [m, 13H, DMTr], 6.61 [d, J = 575.77 Hz, 1H, H-P], 6.21 [dd, 1H, H-1'], 4.73 [m, 1H, H-3'], 4.06 [m, 1H, H-4'], 3.74 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.29-3.16 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.30 [m, 2H, H-2' und H-2''], 2.08 [s, ~1H, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>], 1.37 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 11.39 ppm [s, 1H, N<sup>3</sup>H], 7.65 [s, 1H, H-6], 7.52-6.95 [m, 13H, DMTr], 6.78 [d, J = 583.60 Hz, 1H, H-P], 6.37 [dd, 1H, H-1'], 5.02 [m, 1H, H-3'], 4.20 [m, 1H, H-4'], 3.81 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.47-3.28 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.47 [m, 2H, H-2' und H-2''], 2.13 [s, ~0.8H, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>], 1.47 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

<sup>13</sup>C-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 164.33 ppm [C-4], 159.16 [DMTr], 159.13 [DMTr], 151.29 [C-2], 145.56 [DMTr], 136.34 [DMTr], 136.29 [DMTr], 136.17 [C-6], 130.57 [DMTr], 128.58 [DMTr], 128.42 [DMTr], 127.30 [DMTr], 113.71 [DMTr], 110.51 [C-5], 86.93 [DMTr], 85.70 [C-4'], 84.64 [C-1'], 73.44 [C-3'], 64.39 [C-5'], 55.34 [CH<sub>3</sub>O], 39.39 [C-2'], 11.81 [5-CH<sub>3</sub>]

<sup>31</sup>P-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 2.07 ppm [dd, J<sub>1</sub> = 582.9 Hz, J<sub>2</sub> ≈ 8.5 Hz, H-P]

---

<sup>20</sup> berechnet für Na-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat · 2 H<sub>2</sub>O · 0.15 CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (Die Menge Aceton wurde durch Inegration der betreffenden Signale in den <sup>1</sup>H-NMR - Spektren ermittelt.)

<sup>21</sup> berechnet für Na-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat · 2 H<sub>2</sub>O (Vernachlässigung des Acetons)



**Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-thymidylat-3'-H-phosphonat (48)**

1.09 g (1.64 mmol) Na-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidin-3'-H-phosphonat · 2 H<sub>2</sub>O (**15d**) wurden in 30-40 ml Wasser, das zuvor mit Helium gespült wurde, bei 0°C gelöst, 1 eq 1.04 M KOH (1.577 ml) unter Rühren zugegeben, sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

isolierte Ausbeute: 1.145 g KNa-O<sup>5'</sup>-DMTr-thyd.<sub>H</sub>-3'-H-phosphonat · 4.75 H<sub>2</sub>O  
(93 % Ausbeute)

Analysen:	CHN:	berechnet:	C:49.37	H:5.41	N:3.71	P: 4.1
		gefunden:	C:49.39	H:5.21	N:3.71	P: 4.4

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.42-6.87 ppm [m, 13H, DMTr], 7.21 [s, 1H, H-6], 6.59 [d, J = 573.55 Hz, 1H, H-P], 6.36 [dd, 1H, H-1'], 4.66 [m, 1H, H-3'], 3.97 [m, 1H, H-4'], 3.73 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.17 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.14 [m, 2H, H-2' und H-2''], 1.37 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 7.51-6.92 ppm [m, 13H, DMTr], 7.35<sup>22</sup> [s, 1H, H-6], 6.77 [d, J = 592.25 Hz, 1H, H-P], 6.51 [dd, 1H, H-1'], 4.89 [m, 1H, H-3'], 4.15 [m, 1H, H-4'], 3.77 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.35-3.29 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.46 [m, 1H, H-2'], 2.19 [m, 1H, H-2''], 1.50 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

<sup>31</sup>C-DEPT (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 134.56 ppm [C-6], 130.54 [DMTr], 128.56 [DMTr], 128.37 [DMTr], 127.24 [DMTr], 113.65 [DMTr], 85.12 [C-4'], 85.03 [C-1'], 74.27 [C-3'], 64.61 [C-5'], 55.34 [CH<sub>3</sub>O], 39.78<sup>23</sup> [C-2'], 13.20 [5-CH<sub>3</sub>]

<sup>31</sup>C-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 162.85 ppm [C-4], 159.09 [DMTr], 145.65 [DMTr], 136.40 [DMTr], 136.28 [DMTr], 134.55 [C-6], 130.53 [DMTr], 128.56 [DMTr], 128.37 [DMTr], 127.24 [DMTr], 113.66 [DMTr], 110.80 [C-5], 86.81 [DMTr], 85.08 [C-4'], 85.01 [C-1'], 74.25 [C-3'], 64.58 [C-5'], 55.34 [CH<sub>3</sub>O], 13.20 [5-CH<sub>3</sub>]

<sup>31</sup>P-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 3.25 ppm [dd, J<sub>1</sub> = 591.40 Hz, J<sub>2</sub> ≈ 3.79, H-P]

---

<sup>22</sup> ermittelt durch <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY

<sup>23</sup> Signal ist sehr klein

***trans*-Diamminchloro-N<sup>3</sup>-(O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl)-thymidylat-3'-H-phosphonatoplatin(II)  
(29a)**

646.5 mg (857 µmol) Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat · 4.75 H<sub>2</sub>O (**48**) wurden mit 257.2 mg (1 eq) *trans*-Platin (**1a**) in 6 ml DMF bei 50-60°C unter Abschirmung von Licht für ca. 24 Stunden umgesetzt. Diese Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3) verfolgt. War nach einem Tag noch unplatiniertes Nucleosid erkennbar, erfolgte die weitere Zugabe von ca. 0.1 eq *trans*-Platin (**1a**) und Reaktion über weitere 8 h bei 60°C. Danach wurde auf Raumtemperatur abkühlen und weitere 24 h rühren lassen, anschließend im Vakuum einer Ölpumpe einrotiert, 27 ml Methanol hinzugefügt und wiederum 24 h rühren lassen. Nun wurden die ungelösten Bestandteile abgesaugt, das Filtrat einrotiert, 25 ml Aceton zugegeben und 3 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde abgesaugt und im Vakuum über KOH getrocknet, dabei wurden 758 mg *trans*-Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · KCl · x H<sub>2</sub>O · y Aceton erhalten.

isolierte Ausbeute: 758 mg *trans*-Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · KCl · x H<sub>2</sub>O · y CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (ca. 86 % Ausbeute<sup>24</sup>)

Analysen:	CHN:	berechnet <sup>24</sup> :	C:38.38	H:4.39	N:5.42	Cl:6.9	P:3.0
		gefunden <sup>25</sup> :	C:38.33	H:4.06	N:5.26	Cl:7.2	P:2.9
		berechnet <sup>26</sup> :	C:36.41	H:4.24	N:5.48	Cl:6.9	P:3.0
		gefunden <sup>27</sup> :	C:36.51	H:4.32	N:5.18	Cl:6.2	P:2.8

DC: R<sub>f</sub> = 0.08 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 7.53-6.93 ppm [m, 13H, DMTr], 7.37<sup>28</sup> [s, 1H, H-6], 6.79 [d, J = 576.52 Hz, 1H, H-P], 6.41 [dd, 1H, H-1'], 4.95 [m, 1H,

<sup>24</sup> berechnet für *trans*-Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · KCl · H<sub>2</sub>O · CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>

<sup>25</sup> unmittelbar nach der Synthese bestimmt

<sup>26</sup> berechnet für *trans*-Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · KCl · 3 H<sub>2</sub>O

<sup>27</sup> 2 Jahre nach der Synthese bestimmt; im <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum, das zu diesem Zeitpunkt aufgenommen wurde, konnte kein Signal gefunden werden, das Aceton zuzuordnen ist

<sup>28</sup> ermittelt durch <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY

H-3'], 4.15 [m, 1H, H-4'], 3.89 [s(b), Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 3.80 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.43-3.27 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.38 [m, 1H, H-2'], 2.27 [m, 1H, H-2''], 2.12 [s, 2.6H, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>], 1.47 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

<sup>13</sup>C-DEPT (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 162.84 ppm [C-4], 133.95 [C-6], 130.54 [DMTr], 128.58 [DMTr], 128.39 [DMTr], 127.29 [DMTr], 113.68 [DMTr], 85.57 [C-4'], 85.19 [C-1'], 73.45 [C-3'], 64.44 [C-5'], 55.38 [CH<sub>3</sub>O], 39.74 [C-2'], 13.37 [5-CH<sub>3</sub>]

<sup>13</sup>C-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 171.73 ppm, 162.83 [C-4], 159.13 [DMTr], 156.98 [C-2], 145.60 [DMTr], 136.35 [DMTr], 136.23 [DMTr], 133.94 [C-6], 130.54 [DMTr], 128.58 [DMTr], 128.39 [DMTr], 127.28 [DMTr], 113.67 [DMTr], 109.56 [C-5], 86.85 [DMTr], 64.45 [C-5'], 55.38 [CH<sub>3</sub>O], 13.37 [5-CH<sub>3</sub>]

<sup>31</sup>P-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 1.96 ppm [dd, J<sub>1</sub> = 575.28 Hz, J<sub>2</sub> ≈ 8.5 Hz, H-P]

<sup>195</sup>Pt-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = -2265 ppm

IR (PE): ν = 330 cm<sup>-1</sup> [Pt-Cl]

### ***trans*-Diammindibromoplatin(II) (1c)**

852.3 mg (2.84 mmol) *trans*-Platin (**1a**) wurden mit 1.6 g (7.6 eq) KBr in 14 ml Wasser 24 h bei 90°C und 7 d bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde die Lösung mit Eis gekühlt, abgesaugt, zweimal mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum der Wasserstrahlpumpe getrocknet.

isolierte Ausbeute: 1.033 g *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (93.5 % Ausbeute)

Analysen:	CHN:	berechnet:	C: 0.0	H:1.55	N:7.20	Br:41.1
		gefunden:	C: 0.15	H:1.54	N:7.30	Br:41.5

***trans*-Diamminbromo-N<sup>3</sup>-(O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl)-thymidylat-3'-H-phosphonatoplatin(II) (29c)**

756.3 mg (1 mmol) Kalium-natrium-O<sup>5'</sup>-DMTr-thymidylat-3'-H-phosphonat · 4.75 H<sub>2</sub>O (**48**) wurden mit 407 mg (1.05 eq) *trans*-Diammindibromoplatin(II) (**1c**) in 7 ml DMF analog der Umsetzung mit *trans*-Platin (**1a**) zur Reaktion gebracht und isoliert.

isolierte Ausbeute: 853.7 mg *trans*-Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · x KBr · y H<sub>2</sub>O · z CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.09 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3 (+ 0.5 % TEA))

<sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 7.52-6.94 ppm [m, 13H, DMTr], 7.40<sup>29</sup> [s, 1H, H-6], 6.77 [d, J = 584.35 Hz, 1H, H-P], 6.42 [dd, 1H, H-1'], 4.96 [m, 1H, H-3'], 4.16 [m, 1H, H-4'], 3.87 [s(b), Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 3.80 [s, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.41-3.30 [m, 2H, H-5' und H-5''], 2.45-2.25 [m, 2H, H-2' und H-2''], 2.13 [s, ~2.2H, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>], 1.49 [s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>]

<sup>13</sup>C-DEPT (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 162.79 ppm [C-4], 133.90 [C-6], 130.53 [DMTr], 128.56 [DMTr], 128.39 [DMTr], 127.29 [DMTr], 113.67 [DMTr], 85.54 [C-4'], 85.13 [C-1'], 73.55 [C-3'], 64.44 [C-5'], 55.37 [CH<sub>3</sub>O], 39.74 [C-2'], 13.37 [5-CH<sub>3</sub>]

<sup>13</sup>C-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 162.83 ppm [C-4], 159.12 [DMTr], 156.79 [C-2], 145.59 [DMTr], 136.34 [DMTr], 133.93 [C-6], 130.53 [DMTr], 128.56 [DMTr], 128.39 [DMTr], 127.30 [DMTr], 113.67 [DMTr], 86.84 [DMTr], 85.57 [C-4'], 85.11 [C-1'], 73.54 [C-3'], 64.43 [C-5'], 55.37 [CH<sub>3</sub>O], 39.73 [C-2'], 13.36 [5-CH<sub>3</sub>]

**Trägeranbindung von *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>)]**

101.9 mg (126 μmol) *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd.<sub>H</sub>)] (**34a**) wurden zweimal mit Dioxan (0.4 % TEA) codestilliert, in 1 ml Dioxan gelöst, 11.5 mg (115 μmol) Bernsteinsäureanhydrid (**63**) und im Verlauf von 7 Tagen schrittweise 12 eq TEA zugegeben.

<sup>29</sup> ermittelt durch <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY

Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 7/3$ ) verfolgt. Nach insgesamt 11 Tagen wurde die Lösung einrotiert. Das dabei erhaltene Rohprodukt (128.7 mg), das noch Ausgangsstoff enthält, wurde ohne weitere Reinigung für die weitere Synthese eingesetzt.

19.6 mg (ca. 20  $\mu\text{mol}$ ) dieses Succinoylates (**65a**) wurden in 0.5 ml Dioxan gelöst, ca. 15.5 mg (ca. 2.4 eq) TBTU, 13.7  $\mu\text{l}$  (ca. 5 eq) TEA und 43 mg LCAA-CPG (**64**) zugegeben. Diese Mischung wurde 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt, dann 0.5 ml Wasser zugegeben, den festen Träger abgesaugt und mehrmals mit Methanol und Dioxan gewaschen.

Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach *Atkinson et al.* [55] mit einer Lösung von  $\text{HClO}_4$  in Methanol. Hierzu wurden 5.14 ml 70 %  $\text{HClO}_4$  zu 4.6 ml Methanol gegeben. 0.65 mg des abgesaugten Trägers wurden mit 1.3 ml dieser Lösung versetzt und die Extinktion bei 498 nm bestimmt.

$$E_{498} = 1.573$$

Die Berechnung der Beladung erfolgte nach der Formel:

$$B = E \cdot V \cdot 14.3 / m \quad (m \text{ in mg, } V \text{ in ml}) \quad [55]$$

Hierbei wurde eine Beladung von  $B = 45 \mu\text{mol/g}$  bestimmt.

isolierte Ausbeute: 35.2 mg LCAA-CPG mit einer Beladung von  $B = 45 \mu\text{mol/g trans-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{O}^5\text{'-DMTr-Thyd}_\text{H})]$

Analysen: siehe Abschnitt 8

### **$\text{O}^5\text{'-Dimethoxytrityl-N}^2\text{-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin (68)}$**

Der Schutz der exocyclischen Aminogruppe von 2'-Desoxyguanosin erfolgte nach der Prozedur von *Kung und Jones* [35]. 860.8 mg (3 mmol) 2'-Desoxyguanosin - Monohydrat wurden mit Pyridin codestilliert, in 10 ml Methanol oder Dioxan suspendiert, 3 eq (1.2 ml) Dimethylformamid-dimethylacetal hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nun wurde die Lösung einrotiert, mit Pyridin codestilliert und analog der Prozedur von *Jones* an der 5'-Hydroxygruppe dimethoxytrityliert [52]. Hierzu erfolgte die Zugabe von ca. 20 ml Pyridin, 18 mg (0.05 eq) 4-N,N-Dimethylaminopyridin, 0.58 ml (1.4 eq) Triethylamin und 1.3 g (1.2 eq) Dimethoxytritylchlorid. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel im Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$  verfolgt. Nach

4 Stunden wurde die Lösung einrotiert, zweimal mit Wasser codestilliert und mit Hilfe von Flashchromatographie an Kieselgel im Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 98/2$  (+ 0.4 % TEA) gereinigt.

isolierte Ausbeute: 2.455 g  $\text{O}^5'$ -DMTr- $\text{N}^2$ -DMAM-2'-desoxyguanosin · 2 TEA  
(~ 98 % Ausbeute)

Analysen: DC:  $R_f = 0.25$  (Kieselgel, Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$  (+ 0.5 % TEA))

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 11.34$  ppm [s, ~0.3H,  $\text{N}^1\text{H}$ ], 8.51 [s, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 8.33 [s, ~0.6H,  $(\text{Et}_3\text{N})_2\text{H}^+$ ], 7.91 [s, 1H, H-8], 7.35-6.79 [m, 13H, DMTr], 6.29 [dd, 1H, H-1'], 5.39 [d,  $J = 4.50$  Hz, ~0.3H, 3'-OH], 4.40 [m, 1H, H-3'], 3.96-3.92 [m, 1H, H-4'], 3.72 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ], 3.72 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ], 3.22-3.09 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.11 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 3.03 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 2.86<sup>30</sup> [m, 12H,  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ], 2.72-2.63 [m, 1H, H-2'], 2.35-2.27 [m, 1H, H-2''], 1.11 [t,  $J = 7.16$  Hz, 18H,  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ]

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMF-d}_7$ ):  $\delta \approx 11.3$  ppm [s(sb), ~0.5H,  $\text{N}^1\text{H}$ ], 8.68 [s, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 8.40 [s, ~0.3H,  $(\text{Et}_3\text{N})_2\text{H}^+$ ], 8.01 [s, 1H, H-8], 7.47-6.86 [m, 13H, DMTr], 6.43 [dd, 1H, H-1'], ~5.6 [s (sb), ~0.6H, 3'-OH], 4.62 [m, 1H, H-3'], 4.13 [m, 1H, H-4'], 3.79 [s, 6H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ], 3.40-3.26 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.20 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 3.08 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 2.90-2.82 [m, 1H, H-2'], 2.74 [q,  $J = 7.14$  Hz,  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ], 2.50-2.45 [m, 1H, H-2''], 1.10 [t,  $J = 7.14$  Hz,  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ]

$^{13}\text{C}$ -DEPT ( $\text{DMF-d}_7$ ):  $\delta = 158.61$  ppm [ $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 136.89 [C-8], 130.48 [DMTr], 130.40 [DMTr], 128.52 [DMTr], 128.23 [DMTr], 127.15 [DMTr], 113.51 [DMTr], 86.84 [C-4'], 83.55 [C-1'], 71.88 [C-3'], 65.14 [C-5'], 55.32 [ $\text{CH}_3\text{O}$ ], 46.32 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ], 40.86 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 40.27 [C-2'], 34.68 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 10.60 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ]

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMF-d}_7$ ):  $\delta = 159.23$  ppm [DMTr], 159.20 [DMTr], 158.81 [ $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 158.55 [C-6], 158.32 [C-2], 150.76 [C-4], 145.96 [DMTr], 137.09 [C-8], 136.64 [DMTr], 130.68 [DMTr], 128.71 [DMTr], 128.42 [DMTr], 127.34 [DMTr], 113.70 [DMTr], 87.03 [C-4'], 86.60 [DMTr], 83.74 [C-1'], 79.88, 72.07 [C-3'], 65.33 [C-5'], 55.51 [ $\text{CH}_3\text{O}$ ], 46.52 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ], 41.06 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 40.46 [C-2'], 34.68 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 10.80 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{N}$ ]

---

<sup>30</sup> Signal ist nicht vollständig aufgelöst

### Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-2'-desoxyguanosylat (70)

563 mg O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-2'-desoxyguanosin · 2 TEA (0.68 mmol) wurden in 10 ml Dioxan gelöst, unter Rühren 674 µl 1.01 M KOH (1 eq) zugegeben, sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

isolierte Ausbeute: 470.1 mg Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-2'-desoxyguanosylat

Analysen: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8.51 ppm [s, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N-CH=], 7.87 [s, 1H, H-8], 7.35-6.79 [m, 13H, DMTr], 6.28 [dd, 1H, H-1'], ~5.5 [s(sb), ~0.2H, 3'-OH], 4.40 [m, 1H, H-3'], 3.95 [m, 1H, H-4'], 3.73 [2, 6H, CH<sub>3</sub>O], 3.57 [s, ~2H, Dioxan], 3.18 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.10 [s, 3H, CH<sub>3</sub>-N-], 3.02 [s, 3H, CH<sub>3</sub>-N-], 2.67 [m, 1H, H-2'], 2.42 [q, J = 7.17 Hz, ~1H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N], 2.31 [m, 1H, H-2''], 1.24 [m, ~1H], 0.93 [t, ~1.9H, (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N]

### *trans*-Diamminchloro-N<sub>1</sub>-(O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosylato)-platin(II) (71a)

97.4 mg (325 µmol) *trans*-Platin wurden mit 393 mg (ca. 1.8 eq) Kalium-O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-2'-desoxyguanosylat (70) in 5 ml DMF unter Schutz vor Lichteinwirkung 6 Stunden bei 60°C sowie 1 d bei Raumtemperatur umgesetzt, nachfolgend im Vakuum einer Ölpumpe das DMF abrotiert und den verbliebenen Rückstand chromatographisch an Kieselgel im Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 85/15 - 8/2 (+ 0.4 % TEA) getrennt.

isolierte Ausbeute: 74.7 mg *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(N<sup>1</sup>-(O<sup>5'</sup>-DMTr-N<sup>2</sup>-DMAM-dGua<sub>H</sub>))] · x X<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> · y H<sub>2</sub>O · z TEA (X<sup>+</sup> = K<sup>+</sup>, TEAH<sup>+</sup>)

Analysen: DC: R<sub>f</sub> = 0.38 (Kieselgel, Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/3 (+ 0.5 % TEA))

Molmasse: theoretisch: m/z = 889.3

gefunden<sup>31</sup>: m/z = 891.0

---

<sup>31</sup> siehe auch Tabelle 7

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMF-d}_7$ ):  $\delta = 12.05$  ppm [s(sb),  $\sim 2.5\text{H}$ ,  $\text{N}^7\text{H}$ ], 9.34 [s, 1H, H-8], 8.79 [s, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 8.42 [s,  $\sim 0.6\text{H}$ ,  $(\text{Et}_3\text{N})_2\text{H}^+$ ], 7.48-6.94 [m, 13H, DMTr], 6.47 [dd, 1H, H-1'], 5.94 [s, 1H, 3'-OH], 4.64 [m, 1H, H-3'], 4.38 [s(b),  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ ], 4.10 [m, 1H, H-4'], 3.82 [s, 6H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ], 3.45 [m, 2H, H-5' und H-5''], 3.28 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 3.11 [m, 22H,  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{NH}^+$ ], 3.13 [s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 2.53 [m, 1H, H-2''], 1.31 [t, 38H,  $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{NH}^+$ ]

$^{13}\text{C-DEPT}$  ( $\text{DMF-d}_7$ ):  $\delta = 159.46$  ppm [ $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 130.55 [DMTr], 130.39 [DMTr], 128.57 [DMTr], 128.27 [DMTr], 127.18 [DMTr], 113.56 [DMTr], 87.18 [C-4'], 84.45 [C-1'], 71.45 [C-3'], 65.18 [C-5'], 55.38 [ $\text{CH}_3\text{O}$ ], 45.93 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{NH}^+$ ], 41.20 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 39.87 [C-2'], 34.98 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 8.81 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{NH}^+$ ]

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMF-d}_7$ ):  $\delta = 159.45$  ppm [ $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH=}$ ], 159.12 [C-2], 159.04 [DMTr], 158.99 [DMTr], 157.20 [C-6], 149.74 [C-4], 145.81 [DMTr], 142.47 [C-8], 136.55 [DMTr], 136.38 [DMTr], 130.55 [DMTr], 130.39 [DMTr], 128.57 [DMTr], 128.27 [DMTr], 127.19 [DMTr], 117.41 [C-5], 113.56 [DMTr], 87.19 [C-4'], 86.51 [DMTr], 84.45 [C-1'], 71.46 [C-3'], 65.17 [C-5'], 55.38 [ $\text{CH}_3\text{O}$ ], 45.93 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{NH}^+$ ], 41.20 [ $\text{CH}_3\text{-N-}$ ], 39.87 [C-2'], 8.81 [ $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_3\text{NH}^+$ ]

IR (CsBr):  $\nu = 336\text{ cm}^{-1}$  [Pt-Cl]

### Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe eines trägergebundenen, geschützten Oligonucleotides (58)

Es wurden 400  $\mu\text{l}$  einer Lösung von 0.1 M Salicyloylchlorophosphit (**49**) und 1 M (266  $\mu\text{l}$  in 2 ml Lösung) Collidin in Dioxan verwendet und 15 Minuten mit 0.2  $\mu\text{mol}$  am Träger gebundenem Oligonucleotid reagieren lassen, anschließend wurde der Träger für 3 Minuten mit Acetonitril gespült, für 10 Minuten mit Oxidationslösung<sup>32</sup> behandelt und erneut für 3 Minuten mit Acetonitril gespült.

---

<sup>32</sup> vgl. Abschnitt 6.3



**Ligation von  $trans$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> und d(ATAGTATACAGA) mit 5'-phosphoryliertem d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG)**

Zu 0.8 OD des 5'-phosphorylierten 40-mers der Sequenz d(GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTATCAACGTCG) wurden 0.22 OD d(AGCTTGCATGCCTCTGT), 0.1 OD d(ATAGTATACAGA) bzw.  $trans$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> und 10 µl 5 x Ligase - Puffer zugegeben, auf 47 µl mit Wasser aufgefüllt, eine Minute bei 95°C denaturieren und nachfolgend auf Raumtemperatur abkühlen lassen, 3 µl (15 units) T4 DNA Ligase zugegeben und über Nacht bei 4°C sowie 2 Stunden bei Raumtemperatur reagieren lassen. Nun wurde die Lösung auf ein Volumen von ca. 15 µl einrotiert, 15 µl Formamid zugegeben und eine Minute bei 95°C denaturiert. Die Isolierung des Ligationsproduktes erfolgte durch gelelektrophoretische Reinigung (12 % Acrylamid/Bisacrylamid, 7 M Harnstoff, 1 mm). Die Produktbande wurde ausgeschnitten, das Produkt mit Wasser aus dem Gel herausgelöst und die Lösung mit Sephadex G-25 entsalzt.

isolierte Ausbeute: 0.11 OD

d(ATAGTATACAGAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTT  
TATCAACGTCG) (ca. 29 % Ausbeute)

0.12 OD

d(ATAGTAXACAGAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTT  
TATCAACGTCG) (X =  $trans$ -[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(N<sup>3</sup>-T)]<sup>+</sup>)  
(ca. 31 % Ausbeute)

**$trans$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTCA)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup>**

Eine Menge von ca. 34 mg  $trans$ -Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5</sup>'-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · KCl · x H<sub>2</sub>O · y CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (**29a**) bzw. Na( $trans$ -[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br(O<sup>5</sup>'-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)]) · x KBr · y H<sub>2</sub>O · z CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (**29c**) wurde zweimal mit wenig Pyridin codestilliert, in 1.4 ml Pyridin/Acetonitril = 1/1 gelöst und unter Verwendung der angegebenen Methoden unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese im 0.2 µmol - Synthesemaßstab  $trans$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTCA)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup> synthetisiert. Die Reinigung erfolgte durch präparative HPLC (A: MeOH, B: 0.1 M NH<sub>4</sub>Ac, Gradient: in 30 min von 90 auf 80 % B, in weiteren 10 min auf 65 % B).

isolierte Ausbeute: siehe Tabelle 2

Analysen: siehe Abschnitt 6.3

***trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup>**

Eine Menge von ca. 34 mg *trans*-Na[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)] · KCl · x H<sub>2</sub>O · y CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (**29a**) wurde zweimal mit wenig Pyridin codestilliert, in 1.4 ml Pyridin/Acetonitril = 1/1 gelöst und unter Verwendung der angegebenen Methoden unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese im 0.2 µmol - Synthesemaßstab *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(ATAGTATACAGA)-N<sup>3</sup>-T(7)}]<sup>+</sup> synthetisiert. Die Reinigung erfolgte durch präparative HPLC (A: MeOH, B: 0.1 M NH<sub>4</sub>Ac, Gradient: in 30 min von 82.5 auf 70 % B).

isolierte Ausbeute: siehe Tabelle 2

Analysen: siehe Abschnitt 6.3

***trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTTGTACCAGCT)-N<sup>3</sup>-T(12)}]<sup>+</sup>**

Die Synthese erfolgte unter Verwendung von 0.2 µmol an CPG gebundenem *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] (**66a**) als Startnucleosid, Anwendung der Standardmethoden des Amidit - Verfahren und Entblockung mit konz. Ammoniak - Lösung. Die Reinigung erfolgte durch präparative HPLC (A: MeOH, B: 0.1 M NH<sub>4</sub>Ac, Gradient: in 30 min von 82.5 auf 70 % B).

isolierte Ausbeute: 3.5 OD<sub>260</sub> *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTTGTACCAGCT)-N<sup>3</sup>-T(12)}]<sup>+</sup>  
(ca. 14 % Ausbeute)

Analysen: siehe Abschnitt 8

***trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(TTTG)-N<sup>3</sup>-T(2),N<sup>7</sup>-G(4)}]<sup>+</sup>**

Eine Menge von ca. 26 mg Na(*trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Br(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>-3'-H-phosphonato)]) · x KBr · y H<sub>2</sub>O · z CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (**29c**) wurde in 1.5 ml Lutidin/Acetonitril = 1/1 gelöst und unter Verwendung der angegebenen Methoden der H-Phosphonat - Synthese in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel im 0.2 µmol - Synthesemaßstab *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py{d(CTCA)-N<sup>3</sup>-T(2)}]<sup>+</sup> synthetisiert und für 15 Stunden in 0.01 M wäßriger Natriumacetat - Lösung (pH = 5) bei 60 °C behandelt. Von zwei durchgeführten Synthesen wurde die erste mit konz. wäßriger NH<sub>3</sub> - Lösung entblockt, hierbei wurde das Zielprodukt nicht erhalten. Die zweite Festphasensynthese wurde mit 0.15 M NaOH entblockt, die Hälfte der erhaltenen Lösung wurde mit Hilfe von präp. HPLC (A: MeOH, B: 0.1 M NH<sub>4</sub>Ac, Gradient: in 40 min von 90 auf 20 % B) aufgetrennt. Neben dem Zielprodukt *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(TTTG)-N<sup>3</sup>-T(2),N<sup>7</sup>-G(4)}]<sup>+</sup> wurde dabei hauptsächlich d(TTG) erhalten.

isolierte Ausbeuten: 0.11 OD<sub>260</sub> *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(TTTG)-N<sup>3</sup>-T(2),N<sup>7</sup>-G(4)}]<sup>+</sup>  
(ca. 3 % Ausbeute)

0.75 OD<sub>260</sub> d(TTG) (ca. 25 % Ausbeute)

Analysen: siehe Abschnitt 7.4

## 10.4 Methoden

### Sequenzierung nach *Sanger*

0.3 mOD<sub>260</sub> des zu sequenzierenden Oligonucleotides (40- bzw. 52-mer) wurden in 10 µl TE Pufferlösung (0.1 M Tris · HCl, 5 mM EDTA, pH = 7.5) gelöst, 2 µl wässrige Lösung des 5-Fluo-M13mp18 universal Primers (1 pmol 5'-Fluorescein-d(CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT)) und 3 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde zwei Minuten bei 60°C behandelt, langsam auf Raumtemperatur abkühlen lassen, nachfolgend 2 µl „Annealing Buffer“ (1 M Tris · HCl, pH = 7.6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl „Extension Buffer“ (304 mM Zitronensäure, 324 mM DTT, 40 mM MnCl<sub>2</sub>, pH = 7.5) und 2 µl (4 units) T7 DNA Polymerase - Lösung (20 mM Tris · HCl, pH = 7.5, 0.06 M NaCl, 5 mM DTT, 75 µg/ml BSA, 16 % Glycerol) zugegeben. Auf einer Mikrotiterplatte wurden zu je 2.5 µl Lösung Terminationsmix 1/5 (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM TTP und jeweils 0.2 mM ddATP, ddCTP, ddGTP oder dTTP) bei 37°C jeweils 4.5 µl der zuvor hergestellten Lösung gegeben. Nach 1 bzw. 5 Minuten wurden 5 µl Stop - Lösung (5 mg/ml Dextran-Blau 2000 in deionisiertem Formamid) zugegeben, 2-3 Minuten bei 90°C denaturiert, mit Eis auf 0°C gekühlt und auf ein denaturierendes 6 % Hydrolink Long Ranger Gel (+ 7 M Harnstoff, TBE - Puffer) aufgetragen und getrennt. Die Detektion erfolgte mit einem A.L.F. von *Pharmacia*.

### Sprühreagenzien für die DC

Zum Nachweis der DMTr - Gruppe wurde eine Lösung von EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz) = 4/1 verwendet. Die zum Nachweis von Platin sowie der DMTr - Gruppe benutzte Lösung wurde wie folgt hergestellt [82]: 5.6 g SnCl<sub>2</sub> wurden in 10 ml 36 % HCl gelöst, auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und 0.2 g KI darin gelöst.

## Enzymatische Hydrolyse von Oligonucleotiden

Die Verdauung erfolgte prinzipiell wie in [83] beschrieben. 0.05 OD (oder 0.1 OD) Oligonucleotid wurden in 10 µl 0.04 M Tris · HCl + 0.04 M MgCl<sub>2</sub> - Puffer (pH = 8.8) gelöst, 1 µl (0.1 u) Schlangengift - Phosphodiesterase und 2 µl (2 u) alkalische Phosphatase zugegeben und 1 d bei 37°C reagieren lassen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von HPLC an Nucleosil in einem ternären Gradienten (s. „HPLC - Untersuchungen“ in diesem Abschnitt).

## Deplatinierung

0.02 OD platinisiertes Oligonucleotid wurden in 15 µl 0.1 M Tris · HCl - Puffer (pH = 8.0) gelöst, 15 µl 0.6 M NaCN - Lösung zugegeben und 1 d bei 50°C reagieren lassen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von HPLC an Nucleosil in einem binären Gradienten (s. „HPLC - Untersuchungen“ in diesem Abschnitt).

## HPLC - Untersuchungen

Für alle analytischen HPLC - Untersuchungen an RP-Phase wurde die Shimadzu - HPLC - Anlage verwendet. Alle HPL - Chromatogramme von Gemischen aus Nucleosiden (enzymatisch hydrolysierte Oligonucleotide) sowie der 2-mere wurden an Nucleosil in folgendem ternären Gradienten aufgenommen:

A: 0.01 M TEAHAc - Puffer, pH = 5.5

B: 0.1 M TEAHAc - Puffer, pH = 5.5

C: MeOH

Flußrate: 1 ml/min

Zeit in min	% A	% B	% C	
0	100	0	0	0 bis 30 min
30	0	70	30	nach der Funktion $\frac{e^{2t/30} - 1}{e^2 - 1}$
35	0	70	30	
40	0	50	50	
45	0	50	50	

Für alle anderen analytischen Untersuchungen mit RP - HPLC wurde der folgende binäre Gradient verwendet:

A: MeOH

B: 0.1 M TEAAc - Puffer, pH = 6.5

Flußrate: 1 ml/min

Zeit in min	% A	% B
0	10	90
20	30	70
30	50	50
40	80	20
45	80	20

Für die HPLC - Untersuchungen an Anionenaustausch - Phase, die alle an der GAT - Anlage durchgeführt wurden, wurde in der Regel der folgende Gradient verwendet:

A: 20 % AN in 0.02 M NaAc, pH = 7.0

B: 20 % AN + 1 M KCl in 0.02 M NaAc, pH = 7.0

Flußrate: 1 ml/min

Zeit in min	% A	% B
0	100	0
50	30	70
55	0	100
60	0	100

Die in Abschnitt 8 dargestellten iHPL - Chromatogramme wurden bei einer Flußrate von 2 ml/min in einem vergleichbaren Gradienten aufgenommen, hier wurden jedoch nach 50 min 80 % B erreicht. Die Untersuchungen zur Phosphorylierung des trägergebundenen (T)<sub>5</sub> wurden bei einer Flußrate von 1 ml/min in einem Gradienten von 0 - 50 % B in 50 min durchgeführt.

### Oligonucleotidsynthesen

Soweit nicht anders angegeben ist, wurden alle unmodifizierten Oligonucleotide mit den Standard - Methoden des Gene - Assemblers Special nach dem Phosphoramidit - Verfahren

synthetisiert, mit konz. wäßriger  $\text{NH}_3$  - Lösung entblockt und mit präparativer HPLC an PR-Phase in einem Gradienten von MeOH in 0.1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  gereinigt.

Für die Oligonucleotidsynthese nach dem H-Phosphonat - Verfahren fand folgendes Protokoll Verwendung:

1. Detritylierung (mit der Standard - Methode des Gene - Assemblers Special)
2. Spülen mit  $\text{AN/Base}^{33} = 1/1$  (0.5 min, 2.5 ml/min)
3. Kupplung (200  $\mu\text{l}$  Nucleosid-H-phosphonat - Lösung, 200  $\mu\text{l}$  Aktivierungsreagenz, 2 min)
4. Spülen mit  $\text{AN/Base}^{33} = 1/1$  (0.5 min, 2.5 ml/min)
5. Spülen mit AN (0.8 min, 2.5 ml/min)
6. Spülen mit Dichlorethan (1 min, 2.5 ml/min)
7. Spülen mit AN (0.5 min, 2.5 ml/min)

Die Kupplung des platinieren H-Phosphonates erfolgte in drei Schritten mit jeweils 5 min Kupplungsdauer, Schritt 4 erfolgte für 2 min, die beiden nachfolgenden Spülschritte (5, 6) wurden um eine Minute verlängert. Zur Ankupplung des nachfolgenden, unmodifizierten H-Phosphonates wurden 2 Kupplungsschritte mit jeweils 5 min Kupplungsdauer durchgeführt. Die zur Detritylierung verwendete Mixtur ist eine 1 % Lösung von Dichloressigsäure in Dichlorethan. Als Nucleosid-H-phosphonate wurden 0.025 M Lösungen von  $\text{N}^6$ -Benzoyl- $\text{O}^{5'}$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyadenosin-3'-H-phosphonat,  $\text{N}^4$ -Benzoyl- $\text{O}^{5'}$ -dimethoxytrityl-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat,  $\text{O}^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $\text{N}^2$ -isobutyryl-2'-desoxyguanosin-3'-H-phosphonat und  $\text{O}^{5'}$ -Dimethoxytrityl-thymidin-3'-H-phosphonat als Triethylammonium - Salze in  $\text{AN/Base}^{33} = 1/1$  verwendet. Sollte das Oligonucleotid mit Natronlauge entblockt werden, wurden statt der benzoyl - geschützten H-Phosphonate Triethylammonium- $\text{O}^{5'}$ -dimethoxytrityl- $\text{N}^6$ -isobutyryl-2'-desoxyadenosin-3'-H-phosphonat bzw. Triethylammonium- $\text{O}^{5'}$ -dimethoxytrityl- $\text{N}^4$ -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3'-H-phosphonat verwendet. Als Aktivierungsreagenz wurde in der Regel eine 0.1 M Lösung von Pivaloylchlorid in  $\text{AN/Base}^{33} = 1/1$ , in wenigen Fällen auch eine 0.15 M Lösung von Adamantanoylchlorid genutzt (vgl. Abschnitte 6.1 und 7.3). Die Oxidation erfolgte am Ende der Synthese mit einer Lösung von 2 %  $\text{I}_2$  in  $\text{Base}^{34}/\text{H}_2\text{O} = 98/2$  für 10 min.

---

<sup>33</sup> Pyridin, 2,4,6-Collidin oder 2,6-Lutidin

<sup>34</sup> Pyridin oder 2,6-Lutidin

Bei Kupplungsversuchen unter Verwendung von Gemischen aus AN und MM wurden Gehalte von 1, 5, 10 und 25 % MM in AN als Lösungsmittel und Lösungen von 0.1, 0.3 sowie 1 M Pivaloylchlorid als Aktivierungsreagenz getestet, in wenigen Fällen wurde hier zur Oxidation eine Lösung von 2 %  $I_2$  in TEA/ $H_2O$ /Dioxan = 10/2/88 verwendet. Bei Kupplungsversuchen in AN/DEA = 1/1 als Lösungsmittel wurden Lösungen von 0.1 und 0.2 M Pivaloylchlorid sowie von 0.15 M Adamantanoylchlorid als Aktivierungsreagenz erprobt und der Kupplungsschritt 3 zweimal mit einer Kupplungsdauer von je 10 min durchgeführt.

## Entblockung

Die Entblockung von Oligonucleotiden erfolgte entweder mit konz. wäßriger  $NH_3$  - Lösung oder mit 0.1 - 0.2 M NaOH für 12 - 24 h bei 30 - 50°C. Bei Untersuchungen von Oligonucleotidsynthesen, die in Gemischen aus AN und MM durchgeführt wurden, wurde in einigen Fällen konz. wäßrige  $NH_3$  - Lösung verwendet, die bei 30°C mit NaCl oder KBr gesättigt wurde.

## Crosslink - Bildung / Platinierung an $N^7$ -dGua

Die Ausbildung eines *crosslinks* innerhalb eines Oligonucleotides oder zwischen zwei Oligonucleotiden durch die *trans*- $\{Pt^{II}(NH_3)_2\}^{2+}$  - Spezies bzw. die Platinierung der  $N^7$  - Position von Guanin wurde durch 24 h Behandlung in 0.01 M NaAc - Puffer (pH = 5.0) bei 50°C realisiert.

## Voruntersuchungen zur Reaktivität verschiedener organischer Basen mit *trans*- $[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_H)]$

Hierbei wurde *trans*- $[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_H)]$  (**61a**) für 30 min bei 50°C bzw. 90°C in Py, MM, DEA bzw. Lut/ $H_2O$  = 1/1 behandelt. Die Umsetzung von *trans*- $[Pt^{II}(NH_3)_2Cl(Thyd_H)]$  (**61a**) mit 1H-Tetrazol in großem Überschuß in Wasser erfolgte für 45 min bei 50°C bzw. 90°C. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von HPLC an Nucleosil in einem ternären Gradienten (s. „HPLC - Untersuchungen“ in diesem Abschnitt).



### Bestimmung des Gehaltes der KOH

Die Konzentration der verwendeten wäßrigen KOH - Lösung wurde mit einer Maßlösung von 0.1 M HCl gegen Neutralrot als Indikator titriert.

### Konzentrationsbestimmung der Oligonucleotide

Die Bestimmung der Konzentration der erfolgte mit Hilfe des *Lambert-Beerschen* Gesetzes:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad [84]$$

Die Extinktionskoeffizienten wurde abgeschätzt durch Addition der Extinktionskoeffizienten der 2'-Desoxynucleosid-5'-phosphate bei 260 nm (pH = 7) [85] entsprechend der Anzahl der im Oligonucleotid auftretenden Nucleobasen.

## 11 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Realisierung mehrerer theoretischer Ansätze zur Synthese von Oligonucleotiden, die an gezielter Position mit der *trans*- $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$  - Spezies modifiziert sind. Dabei soll die Basenabfolge möglichst frei wählbar sein, die Platinspezies an einer Nucleobase angebunden sein und die *trans* - Position in der Lage sein, nach Hybridisierung an einer Nucleobase des Gegenstranges zu binden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf zwei verschiedene Prinzipien hierfür hingearbeitet:

Einerseits sollte der Austausch gegen den Chloroliganden mit zwischenzeitlicher Bildung der Hydrolysespezies erfolgen. Da die Platinspezies bereits während der Synthese des Oligonucleotides eingeführt werden muß und es nicht denkbar ist, einen vorzeitigen, unerwünschten Austausch des Chloroliganden zu verhindern, muß die *trans* - Position durch eine geeignete Gruppe besetzt sein, die gezielt wieder abgespalten werden kann. Hierfür sind Thyminderivate geeignet [50]. Nach primärer Anbindung der Platinspezies an Thymidin vor der Oligonucleotidsynthese sollte es nach späterer bifunktionaler Anbindung der Platinspezies (unter Ausbildung eines *intrastrand-crosslinks*) möglich sein, unter Bildung der *trans*- $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}^+$  - Spezies die Nucleobase Thymin wieder zu deplatinieren.

Andererseits ist eine Anbindung der *trans*- $\{\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$  - Spezies am Gegenstrang grundsätzlich mit Hilfe des Prinzips der Doppelhelix - unterstützten Isomerisierung eines *1,3-intrastrand-crosslinks* einer *trans*-Platin - Spezies zu einem platinmodifizierten Basenpaar [6] möglich.

Für die Synthese der platinmodifizierten Oligonucleotide wurden zwei Syntheseverfahren untersucht, das Amidit - Verfahren und das H-Phosphonat - Verfahren. Bei Anwendung des Amidit - Verfahrens wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die Untersuchungen zur Synthese eines platiniierten Nucleosidphosphoramidites haben gezeigt, daß eine Zersetzung der Verbindung stattfindet. Dies wurde durch eine nach Abschluß dieser Arbeiten erschienene Publikation anderer Wissenschaftler bestätigt [57]. Es wurde jedoch auch gezeigt, daß die Phosphitylierung und Ankupplung einer Platinverbindung mit ausschließlich sehr fest bindenden Liganden möglich ist.

Bei Anwendung des H-Phosphonat - Verfahrens wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die Platinierung von  $\text{O}^5'$ -Dimethoxytrityl-thymidin sowie des entsprechenden 3'-H-phosphonates erfolgte nach einer neuen Synthesevariante. Dabei wird das Alkalisalz der Nucleobase im Unterschied zu zuvor bekannten Synthesen direkt mit *trans*-Platin in DMF

umgesetzt. Es wurde gezeigt, daß diese Reaktion auch mit *trans*-Diammindibromoplatin(II) durchführbar ist. Von dem zu synthetisierenden platinieren Synthesebaustein „Pt-T“ wurden zwei Isomere synthetisiert. Das Bromoisomer erwies sich als besser geeignet, da weniger Nebenreaktionen während der Festphasensynthese ablaufen. Weiterhin ist es gelungen, unter Anwendung dieser Platinierungsvariante O<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-dimethylaminomethylen-2'-desoxyguanosin an der N<sup>1</sup>-Position zu platinieren. Damit wurde ein Weg gefunden, ohne Blockierung der N<sup>7</sup> - Position eine Platinierung der N<sup>1</sup> - Position mit hoher Selektivität zu realisieren. Der Umsetzungsgrad liegt jedoch nur bei 40-50 %, die Ausbeute ist daher nur gering, sowohl die eigentliche Synthese als auch die Isolierung muß optimiert werden. Diese Platinierung sollte sich auf das betreffende H-Phosphonat übertragen lassen, dies konnte jedoch nicht mehr synthetisiert werden.

Unter den Bedingungen der Standard - H-Phosphonat - Synthese werden bei Verwendung des synthetisierten platinieren Synthesebaustein „Pt-T“ platierte Oligonucleotide erhalten, die eine *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(N<sup>3</sup>-T)]<sup>+</sup> - Modifizierung enthalten. Damit konnte nachgewiesen werden, daß die direkte Einführung eines platinieren Nucleosides während der Festphasensynthese eines Oligonucleotides möglich ist, damit wurde ein wichtiges Zwischenziel erreicht. Mit Hilfe der *Sanger* - Sequenzierung konnte gezeigt werden, daß die an T angebundene *trans*-{Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py}<sup>2+</sup> - Platinspezies T7 DNA Polymerase blockiert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Spaltung der 5'-Phosphorsäurediesterbindung durch Schlangengift - Phosphodiesterase infolge dieser Platinmodifizierung deutlich langsamer abläuft.

Da eine Koordination des Platins zum Gegenstrang bei Vorliegen einer *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Py(N<sup>3</sup>-T)]<sup>+</sup> - Spezies nicht zu erwarten ist [61], erfolgten Untersuchungen zur Verwendung einer anderen Base als Ersatz für Pyridin während der H-Phosphonat - Synthese. 2,6-Lutidin erwies sich als sehr gut geeignet. Bei Entblockung des synthetisierten platinieren Oligonucleotides mit konz. Ammoniaklösung zeigten sich Effekte, die auf unspezifische Wechselwirkungen, verursacht durch Interaktion des Platins, zurückzuführen sind. Dies kann weitestgehend vermieden werden, wenn Natronlauge anstelle von konz. Ammoniaklösung verwendet wird. Durch geeignete Reaktionsbedingungen wurde das nach erfolgter Oligonucleotidsynthese an einem 4-mer gebundene Platin bifunktional an den selben Strang gebunden und so *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(TTTG)-N<sup>3</sup>-T(2),N<sup>7</sup>-G(4)}]<sup>+</sup>, ein kurzes Oligonucleotid mit *intrastrand-crosslink*, synthetisiert. Auf die Position der Platinierung an N<sup>7</sup> von Guanosin kann nach bisher durchgeführten Untersuchungen jedoch nur aufgrund der Reaktionsbedingungen während der zweiten Anbindung des Platins am Oligonucleotid geschlossen werden. Die durchgeführte enzymatische Hydrolyse zeigt eine hohe Beständigkeit gegenüber dem Abbau mit Schlangengift - Phosphodiesterase und

alkalischer Phosphatase. Bei der Bildung des *intrastrand-crosslinks* entstehen jedoch mehrere Produkte, das genannte Produkt war in diesem Fall nicht das Hauptprodukt und entstand daher nur in geringer Ausbeute. Ein längeres Oligonucleotid dieser Art konnte nicht mehr synthetisiert werden, mit diesem könnten dann Hybridisierungsexperimente durchgeführt werden, die eine Koordination des Platins am Gegenstrang zeigen sollten.

Ein weiterer Ansatz zur Synthese platinmodifizierter Oligonucleotide ist der Einsatz eines trägergebundenen platinieren Nucleosides als Startnucleosid für die Oligonucleotidsynthese. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Es ist gelungen, 3'-trägergebundenes *trans*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(O<sup>5'</sup>-DMTr-Thyd<sub>H</sub>)] zu synthetisieren. Dieses ist geeignet, als platinierter Startnucleosid für Festphasen - Oligonucleotidsynthesen eingesetzt werden. Die durchgeführten Untersuchungen weisen deutlich darauf hin, daß auch dieser Ansatz geeignet ist, unter geeigneten Bedingungen platinierter Oligonucleotide zu synthetisieren, die ein *intrastrand-crosslink* enthalten.

## 12 Danksagung

Meinem langjährigen wissenschaftlichen Betreuer, dem Ende 1996 viel zu früh verstorbenen Herrn Prof. D. Cech, danke ich für die nach einer Idee von Prof. B. Lippert mir übertragene Aufgabenstellung, für die guten Arbeitsbedingungen in der Arbeitsgruppe sowie für seine ständige Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen, denen ich wertvolle Anregungen verdanke. Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für zahlreiche Diskussionen und das gute Arbeitsklima.

Herrn Prof. B. Lippert und Herrn Dr. U. Berghoff von der Universität Dortmund danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des ersten Abschnittes meiner Arbeit sowie für die Durchführung der  $^{195}\text{Pt}$ -NMR - Messung.

Herrn Prof. U. Koert danke ich für die Möglichkeit, nach dem Tode von Herrn Prof. D. Cech meine Arbeiten fortsetzen zu dürfen sowie dafür, diese Arbeit als Promotion einreichen zu können.

Für die Anfertigung aller anderen NMR - Spektren danke ich allen betreffenden Mitarbeitern der AG Analytik der Humboldt - Universität zu Berlin, insbesondere Frau B. Schieffner sowie Frau A. Thiesies.

Herrn Dr. A. Jäschke von der Freien Universität Berlin danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie seine engagierte Betreuung während meiner Arbeiten zur weiteren Charakterisierung, insbesondere zur Sequenzierung des platinmodifizierten 12-mers im Rahmen des letzteren Abschnittes meiner Arbeit. Mein Dank gilt auch all seinen Mitarbeitern für das gute Arbeitsklima.

Für die Durchführung von MALDI - Messungen danke ich Frau Dr. S. Hahner und Herrn Prof. Hillenkamp vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik in Münster einerseits Herrn Dr. D. Winkler sowie Dr. J. Schneider-Mergener vom Institut für Medizinische Immunologie der Humboldt - Universität zu Berlin andererseits.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. M. Sigmund von der Humboldt - Universität zu Berlin für die Anfertigung von IR - Spektren.

Herrn Dr. Franke von der Freien Universität Berlin möchte ich für die Molmassenbestimmung mit Ionenspray danken.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Humboldt - Universität zu Berlin.

## **13      Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

## 14 tabellarischer Lebenslauf

### Jürgen Schliepe

Friedenstr. 57  
Berlin  
10249

Institut für organische Chemie und bioorganische Chemie der  
Humboldt-Universität zu Berlin  
Hessische Str. 1-2  
Berlin  
10115

### Persönliche Angaben

Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Alter: 33  
Geburtsort: Berlin

### Ausbildung/Qualifikation

09/72 - 08/80	Schulbesuch 6. POS Berlin-Mitte Abschluß: 8. Klasse
09/80 - 08/84	Schulbesuch EOS „Max Planck“ Berlin-Mitte Abschluß: Abitur Prädikat: sehr gut
09/84 - 10/84	techn. Mitarbeiter Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Kybernetik und Informationsprozesse
11/84 - 10/87	Wehrdienst NVA, Unteroffiziersschule, Panzerregiment Dienstgrad: Feldwebel
11/87 - 09/92	Studium der Chemie, Fachrichtung: Synthesechemie Humboldt-Universität zu Berlin Abschluß: Diplomchemiker, Gesamtprädikat : gut
4. Semester	1. Forschungspraktikum, Thema: Untersuchung der Entladung von Deuteriumionen unter Überspannungsbedingungen in LiOD an Palladium Institut für physikalische Chemie der HUB, Prof. Müller

	Gefunden wurde eine oberflächliche reversible Einlagerung von Lithiumatomen in das Palladiumgitter
6. Semester, 8. Semester	2. Forschungspraktikum, Thema: Katodische Reduktion von Benzaldehydhydroxamsäurechloriden in aprotischen Lösungsmitteln Institut für organische Chemie der HUB, Prof. W. Jugelt Es konnte gezeigt werden, daß die Hydroxamsäurechloride unter den untersuchten Bedingungen zu den entsprechenden Benzaloximanionen reduziert werden, die in Hydroxidionen und die entsprechenden Nitrile zerfallen. Benzaloxime reagieren auf einem verzweigten Reaktionsweg, bei welchem hauptsächlich wiederum die entsprechenden Nitrile gebildet werden.
8. Semester	Industriepraktikum, Thema: Methoden zu Bestimmung des Gehaltes an freiem Wasser im Kalkstickstoff sowie Bestimmung des Hydratationsgrades des Calciumoxids im Kalkstickstoff Stickstoffwerke AG Piesteritz, Dr. Alter/ Dr. Kauschka Als Ergebnis des Praktikums konnte festgestellt werden, daß sehr viele Verfahren zur Feuchtebestimmung aufgrund der besonderen stofflichen Zusammensetzung des Kalkstickstoffs nur sehr bedingt bzw. gar nicht eingesetzt werden können, als günstigste der untersuchten Methoden wurde die Verwendung einer Trockenpistole festgestellt.
9./10. Semester	Diplomarbeit, Thema: Untersuchungen zur indirekten anodischen Oxidation von Benzaldehydphenylhydrazonen mit Thianthren als Mediator sowie zur Folgereaktion der Intermediate Institut für organische Chemie der HUB, Prof. W. Jugelt Die Arbeit umfaßt sowohl präparative elektroorganische Synthesen neuer 1,2,4-Benzotriazole als auch mechanistische Untersuchungen, die die Aufstellung des Reaktionsmechanismus als Ergebnis hatten. Prädikat für die Diplomarbeit/Verteidigung: gut/sehr gut
10/92 - 08/98	Arbeiten zur Promotion, Thema: Synthese von metallmodifizierten Oligonucleotiden mit genregulatorischen Eigenschaften Institut für organische Chemie und bioorganische Chemie der HUB, Prof. D. Cech
10/92 - 12/95	DFG-Projekt mit dem Thema: Synthese von metallmodifizierten Oligonucleotiden mit genregulatorischen Eigenschaften Institut für organische Chemie und bioorganische Chemie der HUB, Prof. D. Cech Es wurde ein mit automatischer Festphasensynthese einbaufähiges platinisiertes Nucleosid-H-phosphonat hergestellt und so platin-modifizierte Oligonucleotide synthetisiert.
01/96 - 12/96	HEP-Stipendium, inhaltliche Fortsetzung des DFG-Projektes Institut für organische Chemie und bioorganische Chemie der HUB, Prof. D. Cech, Institut für Biochemie der FU Berlin, Dr. A. Jäschke Es erfolgten Untersuchungen zur Synthese platinierter Oligonucleotide



	mit größerer Anwendbarkeit gegenüber den vorher synthetisierten. Weiterhin wurden die bereits synthetisierten platinieren Oligos weitergehend charakterisiert durch enzymatische Sequenzierung nach <i>Sanger</i> am A.L.F. (Pharmacia)
11/96	Tod des wissenschaftlichen Betreuers Prof. Dr. D. Cech
01/97 - 05/97	Durchführung experimenteller Arbeiten zur inhaltlichen Ergänzung der Promotionsarbeit
06/97 - 08/98	Zusammenschreiben der Ergebnisse und Anfertigung der Promotionsarbeit
09/98	Einreichen der Promotionsarbeit

### **Veröffentlichung**

Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D.: Automated solid phase synthesis of platinated oligonucleotides via nucleoside phosphonates. In: *Angew Chem Int Ed* **35**(6), 1996, 646-648

## 15 Anlagen

### Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
10	C	0.45	0.75	1259	130	-	-
9	C	0.23	0.64	503	50	-	-
8	C	0.45	0.68	1028	108	217.2	100.0
7	C	0.45	0.68	901	92	85.2	100.0
Last step efficiency for base 7 lower than threshold							
6	T	0.47	0.67	967	102	-	-
5	T	0.47	0.71	916	100	-	-
4	T	0.47	0.67	927	99	-	-
3	C	0.21	0.71	802	86	98.3	100.0
2	C	0.47	0.65	802	85	99.1	100.0
1	C						

Total synthesis yield from start = 100.0 %

Anlage 1: Syntheseprotokoll der Oligonucleotid-Synthese von O<sup>5'</sup>-DMTr-d(CCCTTTCCCC) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit Pivaloylchlorid als Aktivierungsreagenz

### Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
10	C	0.44	0.63	1229	119	-	-
9	C	0.46	0.63	1060	110	-	-
8	C	0.46	0.62	981	101	92.0	92.0
7	C	0.46	0.62	912	94	93.3	92.6
6	T	0.48	0.62	860	93	-	-
5	T	0.49	0.64	818	91	-	-
4	T	0.25	0.68	791	90	-	-
3	C	0.48	0.62	750	82	96.6	94.0
2	C	0.47	0.60	736	78	95.4	94.3
1	C						

Total synthesis yield from start = 59.1 %

Anlage 2: Syntheseprotokoll der Oligonucleotid-Synthese von O<sup>5'</sup>-DMTr-d(CCCTTTCCCC) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsreagenz

### Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
12	A	0.55	0.80	446	73	-	-
11	G	0.49	0.80	544	89	-	-
10	A	0.55	0.80	504	86	-	-
9	C	0.55	0.80	607	106	-	-
8	A	0.55	0.80	528	96	105.8	100.0
7	X	0.61	0.80	769	131	-	-
6	A	0.56	0.80	688	119	-	100.0
5	T	0.57	0.80	510	87	-	100.0
4	G	0.53	0.80	487	83	99.0	100.0
3	A	0.56	0.80	536	93	99.3	100.0
2	T	0.58	0.80	480	84	99.0	100.0
1	A	0.57	0.88	491	87	96.9	100.0

Total synthesis yield from start = 100.0 %

Anlage 3: Syntheseprotokoll der in Abb. 37b gezeigten Produkte der Synthese von d(ATAGTAXACAGA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit dem Chloroisomer des platiniierten Synthesebausteins

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
4	A	0.67	0.80	278	75	-	-
3	C	0.58	0.80	625	111	-	-
2	X	0.59	0.80	568	122	-	-
1	C	0.55	1.39	551	129	-	-

Total synthesis yield from start = -

Anlage 4: Syntheseprotokoll der in Abb. 38b gezeigten Produkte der Synthese von d(CXCA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit dem Bromoisomer des platiniierten Synthesebausteins

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
4	A	0.52	0.78	1178	144	-	-
3	C	0.54	0.80	1445	186	-	-
2	X	0.57	0.80	909	123	-	-
1	C	0.56	0.90	1303	172	-	-

Total synthesis yield from start = -

Anlage 5: Syntheseprotokoll der in Abb. 38c gezeigten Produkte der Synthese von d(CXCA) (X = Pt-T) unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese mit dem Bromoisomer des platiniierten Synthesebausteins bei Verwendung von 0.3 µmol Startnucleosid und Durchführung der Synthese im 0.2 µmol - Synthesemaßstab

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
4	T	0.44	0.56	734	76	-	-
3	T	0.42	0.68	445	49	-	-
2	T	0.43	0.70	545	61	122.4	100.0
1	T	0.43	0.80	582	67	110.1	100.0

Total synthesis yield from start = 100.0 %

Anlage 6: Syntheseprotokoll von (T)<sub>4</sub>, synthetisiert nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit zweifacher Menge an Aktivierungsreagenz Pivaloylchlorid und doppeltem Substanzaufwand pro Kupplungsschritt in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
4	T	0.36	0.30	16	2	-	-
3	T	0.40	0.72	591	62	-	-
2	T	0.40	0.73	644	68	109.2	100.0
1	T	0.41	0.79	682	73	107.7	100.0

Total synthesis yield from start = 100.0 %

Anlage 7: Syntheseprotokoll der Synthese von (T)<sub>15</sub> durch Verlängerung des unter Standardbedingungen der H-Phosphonat - Synthese hergestellten (T)<sub>12</sub> um (T)<sub>3</sub> nach dem H-Phosphonat - Verfahren mit Adamantanoylchlorid als Aktivierungsmittel in N,N-Diethylanilin/AN = 1/1 als Lösungsmittel

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
4	G	0.41	0.08	185	3	-	-
3	C	0.58	0.80	406	96	-	-
2	X	0.56	0.80	1656	343	-	-
1	C	0.56	1.64	284	86	94.9	94.9

Total synthesis yield from start = 85.4 %

Anlage 8: Syntheseprotokoll der Synthese von d(CXCG) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ nach zweifacher Codestillation mit AN nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
2	T	0.57	0.80	789	109	-	-
1	X	0.50	1.22	3001	448	-	-

Total synthesis yield from start = -

Anlage 9: Syntheseprotokoll der Synthese von d(XT) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ nach zweifacher Codestillation mit AN nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel

## Gene Assembler Special

Pos	Base	Retention mins	Duration mins	Peak ht %FS	Acc Area %min	Last eff %	Ave eff %
2	T	0.66	0.80	661	94	-	-
1	X	0.59	1.10	1189	188	-	-

Total synthesis yield from start = -

Anlage 10: Syntheseprotokoll der Synthese von d(XT) (X = Pt-T) unter Verwendung des Bromoisomers des Synthesebausteines „Pt-T“ ohne vorherige Codestillation nach dem H-Phosphonat - Verfahren in Lut/AN = 1/1 als Lösungsmittel

## 16 Literaturverzeichnis

- [1] Uhlmann, E.; Peymann, A.: Antisense Oligonucleotides - A New Therapeutic Principle. In: *Chemical Reviews* **90**(4), 1990, 543-584
- [2] Lönnberg, H.; Vuorio E.: Towards Genomic Drug-Therapy with Antisense Oligonucleotides. In: *Annals of Medicine* **28**(6), 1996, 511-522
- [3] Thoung, N. T.; Hélène, C.: Sequenzspezifische Erkennung und Modifikation von Doppelhelix - DNA und Oligonucleotide. In: *Angewandte Chemie* **105**, 1993, 697-723
- [4] Green, P. J.; Inouye, M.; Pines, O.: The Role of Antisense RNA in Gene-Regulation. In: *Annual Review of Biochemistry* **55**, 1986, 569-597
- [5] Zelphati, O.; Szoka, F. C.: Liposomes as a Carrier for Intracellular Delivery of Antisense Oligonucleotides - A Real or Magic Bullet. In: *Journal of Controlled Release* **41**(1-2), 1996, 99-119
- [6] Dalbies, R.; Payet, D.; Leng, M.: DNA double helix promotes a linkage isomerization reaction in trans-diamminedichloroplatinum(II)-modified DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(17), 1994, 8147-8151
- [7] Colombier C.; Boudvillain M.; Leng M.: Interstrand Cross-Linking Reaction in Transplatin-Modified Oligo-2'-O-Methyl Ribonucleotide-RNA Hybrids. In: *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **7**(4), 1997, 397-402
- [8] Boudvillain M.; Guerin M.; Dalbies R.; Saisonbehmoaras T.; Leng M.: Transplatin-Modified Oligo(2'-O-Methyl Ribonucleotide)s - A New Tool for Selective Modulation of Gene-Expression. In: *Biochemistry* **36**(10), 1997, 2925-2931
- [9] Dieter-Wurm, I.; Sabat, M.; Lippert, B.: Model for a Platinated DNA Triplex - Watson-Crick and Metal-Modified Hoogsteen Pairing. In: *Journal of the American Chemical Society* **114**(1), 1992, 357-359
- [10] Krizanovic, O.; Sabat, M.; Beyerle-Pfnur, R.; Lippert, B.: Metal-Modified Nucleobase Pairs - Mixed Adenine, Thymine Complexes of trans-a<sub>2</sub>Pt<sup>(II)</sup> (a = NH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>) with Watson - Crick and Hoogsteen Orientations of the Bases. In: *Journal of the American Chemical Society* **115**(13), 1993, 5538-5548
- [11] Lippert, B.: Platinum Nucleobase Chemistry. In: *Progress in Inorganic Chemistry* **V 37**, 1989, 1-97
- [12] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T.: Inhibition of cell division in E. coli by elektrolysis products from a platinum elektrode. In: *Nature (London)* **205** (1965), 689

- [13] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mamsour, V. H.: Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. In: *Nature (London)* **222** (1969), 385-386
- [14] Roberts, J. J.; Knox, R. J.; Friedlos, F.; Lydall, D. A. DNA as the target for the cytotoxic and antitumor action of platinum coordination complexes: comparativ in vitro and in vivo studies of cisplatin and carboplatin. In: McBrien, D. C. H., Slater, T. F., eds *Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumor Drugs*. Oxford: IRL Press 1986; 29-64
- [15] Lippard, S. J.; Berg, J. M.: Bioanorganische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin · Oxford 1995, S. 216ff
- [16] Petsko, G. A.: Heavy metal revival. In: *Nature* **377**, 1995, 580-581
- [17] Lippert, B.: From Cisplatin to Artificial Nucleases - The Role of Metal Ion Nucleic Acid Interactions in Biology. In: *Biomaterials* **5**(4), 1992, 195-208
- [18] Bernalmendez, E.; Boudvillain M.; Gonzalezvilchez F.; Leng M.: Chemical Versatility of Transplatin Monofunctional Adducts Within Multiple Site-Specifically Platinated DNA. In: *Biochemistry* **36**(24), 1997, 7281-7287
- [19] Eastman, A.; Barry, M. A.: Interactions of trans-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation of Monofunctional Adducts and Their Reaction with Glutathione. In: *Biochemistry* **26**(12), 1987, 3303-3307
- [20] Bancroft, D. P.; Lepre, A.; Lippard, S. J.:  $^{195}\text{Pt}$  NMR Kinetic and Mechanistic Studies of cis- and trans-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA. In: *Journal of the American Chemical Society* **112**(19), 1990, 6860-6871
- [21] Sherman, S. E.; Lippard, S. J.: Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug Interactions with DNA. In: *Chemical Reviews* **87**(5), 1987, 1153-1181
- [22] Holler, E.: Mechanism of Action of Tumor-Inhibiting Metal Complexes. In: Keppler, B. K., eds *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*. VCH, Weinheim 1993, 37-71
- [23] Colombier, C.; Lippert, B.; Leng, M.: Interstrand Cross-Linking Reaction in Triplexes Containing a Monofunctional Transplatin-Adduct. In: *Nucleic Acids Research* **24**(22), 1996, 4519-4524
- [24] Lepre, C. A.; Chassot, L.; Costello, C. E.; Lippard, S. J.: Synthesis and Characterization of trans-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] Adducts of d(CCTCGAGTCTCC)·d(GGAGACTCGAGG). In: *Biochemistry* **29**(3), 1990, 811-823

- [25] Naser, L. J.; Pinto, A. L.; Lippard, S. J.; Essigmann, J. M.: Chemical and Biological Studies of the Major DNA Adduct of cis-Diamminedichloroplatinum(II), cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GpG)}], Built into a Specific Site in a viral Genome. In: *Biochemistry* **27**(12), 1988, 4357-4367
- [26] Lepre, C. A.; Strothkamp, K. G.; Lippard, S. J.: Synthesis and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Characterisation of trans-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(ApGpGpCpCpT)-N<sup>7</sup>-A(1),N<sup>7</sup>-G(3)}]. In: *Biochemistry* **26**(18), 1987, 5651-5657
- [27] Lepre, C. A.; Lippard, S. J.: Nucleic Acids and Molekular Biology. (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Heidelberg 1990, Vol. 4, S. 9-38
- [28] Schaller, W.; Reisner, H.; Holler, E.: Kinetic Investigation of the DNA Platination Reaction - Evidence for a Transient Adduct Between Deoxyribonucleic-Acid and Cis-Platinum(II). In: *Biochemistry* **26**, 1987, 943-950
- [29] Scheller, K. H.; Scheller-Krattiger, V.; Martin, R. B.: Equilibria in Solutions of Nucleosides, 5'-Nucleotides, and dienPd<sup>2+</sup>. In: *Journal of the American Chemical Society* **103**(23), 1981, 6833-6839
- [30] Raudaschl-Sieber, G.; Lippert, B.: Reaction of Cyanide with Pt-Nucleobase Complexes: Preparative, Spectroscopic, and Structural Studies. Unexpected Stability of Pt-Thymine and Pt-Uracil Complexes. In: *Inorganic Chemistry* **24**, 1985, 2426-2432
- [31] Nucleic Acids in Chemistry and Biology. (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), IRL Press Oxford, S. 111ff
- [32] Protocols for Oligonucleotides and Analogs. In: Agrawal, S., eds *Methods in Molekular Biology*. Volume 20, Humana Press Totowa, New Jersey, 1993, 19-80
- [33] Christodoulou, C.: Oligonucleotids Synthesis: Phosphotriester - Approach, In: Protocols for Oligonucleotides and Analogs. In: Agrawal, S., eds *Methods in Molekular Biology*. Volume 20, Humana Press Totowa, New Jersey, 1993, 19-32
- [34] Shabarova, Z.; Bogdanov, A.: Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids. VCH Weinheim 1994
- [35] Kung, P. P.; Jones, R. A.: H-Phosphonate DNA Synthesis Without Amino Protection. In: *Tetrahedron Letters* **33**(40), 1992, 5869-5872
- [36] B. C. Froehler, Oligonucleotids Synthesis: H-Phosphonate - Approach, In: Protocols for Oligonucleotides and Analogs. In: Agrawal, S., eds *Methods in Molekular Biology*. Volume 20. Humana Press Totowa, New Jersey, 1993, 63-80
- [37] Oligodeoxyribonucleotide Synthesis Using Pharmacia Gene Assambler Plus and H-Phosphonate Chemistry. *Pharmacia GMBH*

- [38] Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.: Nucleoside H-Phosphonates. V. The mechanism of Hydrogen-phosphonate Diester Formation Using Acyl Chlorides as Coupling Agents in Oligonucleotide Synthesis by the H-Phosphonate Approach. In: *Nucleosides & Nucleotides* **6**(3), 1987, 655-662
- [39] Kers; A.; Kers; I.; Kraszewski; A.; Stawinski; J.:  $^{31}\text{P}$  NMR Studies on the Activation Pathways of Aryl H Phosphonate Esters with Condensing Agents. In: *Collection of the Czechoslovak Chemical Communications* **61**, 1996, 246-249
- [40] Дубей, И. Я.; Ефимоф, В. А.; Ляпина, Т. В.; Федоряк, Д. М.: Нуклеофильные катализаторы в реакции Н-фосфонатой межнуклеотидной конденсации. In: *Биоорганическая Химия* **18**(7), 1992, 911-919
- [41] Cairns, M. J.; Murray, V.: Comparison of the sequence specificity of cis-diamminedichloroplatinum (II) damage in guanine- and 7-deazaguanine-containing DNA. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1218**(3), 1994, 315-321
- [42] Nylén, P.: Die Kinetik der Verseifung von Dialkylphosphiten. In: *Svensk Kemisk Tidskrift* **49**(2), 1937, 29-52
- [43] Garegg, P. J.; Regberg, T.; Strawinsky, R.; Strömberg, R.: Nucleoside Phosphonates: Part 7. Studies on the Oxidation of Nucleoside Phosphonate Esters. In: *Journal of the Chemical Society - Perkin Transaction I* 1987, Nr. 6, S. 1269-1273
- [44] Froehler, B. C.: Deoxynucleoside H-Phosphonate Diester Intermediates in the Synthesis of Internucleotide Phosphate Analogues, *Tetrahedron Letters* **27**(46), 1986, 5575-5586
- [45] Gaffney, B. L.; Jones, R. A.: Large-Scale Oligonucleotide Synthesis by the H-Phosphonate Method, *Tetrahedron Letters* **29**(22), 1988, 2619-2622
- [46] Венъяминова, А. Г.; Левина, А. С.; Репкова, М. Н.; Ченцова, Н. А.: Фосфорилирование олигонуклеотидов с использованием  $\beta$ -цианэтилфосфита. In: *Биоорганическая Химия* **15**(6), 1989, 844-846
- [47] Филиппов, С. А.; Есипов, Д. С.; Калиниченко, С. В.; Добрынин, В. Н.: Синтез 5'-фосфорилированных олигодезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным методом. In: *Биоорганическая Химия* **15**(4), 1989, 527-529
- [48] Schöllhorn, H.; Thewalt, U.; Lippert, B.: Metal-Stabilized Rare Tautomers of Nucleobases .2. 2-Oxo-4-Hydroxo Form of Uracil - Crystal-Structures and Solution Behavior of 2 Platinum(II) Complexes



- Containing Iminol Tautomers of 1-Methyluracil. In: *Journal of the American Chemical Society* **111**(18), 1989, 7213-7221
- [49] Lippert, B.: Rare Iminol Tautomer of 1-Methylthymine Through Metal Coordination at N(3). In: *Inorganica Chimica Acta* **55**(1), 1981, 5-14
- [50] persönliches Gespräch mit Prof. B. Lippert, Fachbereich Chemie der Universität Dortmund
- [51] Cotton, F. A.; Wilkinson, G.: *Anorganische Chemie*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften · Berlin 1967, S. 163
- [52] Jones, R. A.: Preparation of Protected Desoxyribonucleosides. In: Gait, M. J., eds *Oligonucleotide synthesis : A practical approach*. Oxford: IRL Press, 23-34
- [53] Szabó, T.; Almer, H.; Strömberg, R.; Stawinski, J.: 2-Cyanoethyl H-phosphonate. A reagent for the mild preparation of nucleoside H-phosphonate monoesters. In: *Nucleosides & Nucleotides* **14**(3-5), 1995, 715-716
- [54] Lock, C. J. L.; Pilon, P.; Lippert, B.: Potassium Thyminate Trihydrate,  $K(C_5H_5N_2O_2) \cdot 3 H_2O$ . In: *Acta Crystallographica Section B* **35**, 1979, 2533-2537
- [55] Atkinson, T.; Smith, M.: Solid-phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Phosphite-triester Method. In: Gait, M. J., eds *Oligonucleotide synthesis : a practical approach*. Oxford: IRL Press, 35-81
- [56] Barone, A.D.; Tang, J.-Y.; Caruthers, M.H.: In situ activation of bis-dialkylaminophosphines - a new method for synthesizing deoxynucleotides on polymer support. In: *Nucleic Acids Research* **12**(10), 1984, 4051-4061
- [57] Manchanda, R.; Dunham, S. U.; Lippard, S. J.: Automated Solid-Phase Synthesis on Site-Specifically Platinated Oligodeoxynucleotide. In: *Journal of the American Chemical Society* **118**(21), 1996, 5144-5145
- [58] Garegg, P. J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.: Nucleoside H-Phosphonates. III. Chemical Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Hydrogenphosphonate Approach. In: *Tetrahedron Letters* **27**(34), 1986, 4051-4054
- [59] Marugg, J. E.; Tromp, M.; Kuyl-Yesheskiely, E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.: A Convenient and General Approach to the Synthesis of Properly Protected d-Nucleoside-3'-Hydrogenphosphonates via Phosphite Intermediates. In: *Tetrahedron Letters* **27**(23), 1986, 2661-2664
- [60] Appleton, T. G.; Bailey, A. J.; Barnham, K. J.; Hall, J. R.: Aspects of the Solution Chemistry of Trans-Diammineplatinum(II) Complexes. In: *Inorganic Chemistry* **31**(14), 1992, 3077-3082

- [61] Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D.: Automatisierte Festphasensynthese platinierter Oligonucleotide via Nucleosidphosphonate. In: *Angewandte Chemie* **108**(6), 1996, 705-707
- [62] Dr. Franke, FU Berlin
- [63] Eastman, A.; Jennerwein, M. M.; Nagel, D. L.: Characterization of Bifunctional Adducts Produced in DNA by trans-Diamminedichloroplatinum(II). In: *Chemico-Biological Interactions* **67**, 1988, 71-80
- [64] Eastman, A.: Reevaluation of Interaction of cis-Dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. In: *Biochemistry* **25**(13), 1986, 3912-3915
- [65] Ibelgauf, H.: Gentechnologie von A bis Z, 1., korrigierter Nachdruck, Studienausgabe, Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH, 1992
- [66] Рейнтамм, Т.; Мёллер, У.; Орецкая, Т. С.; Шабарова, З. А.; Ломакин, А. И.: Полуавтоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов с концевыми фосфатными группами гидрофосфорильным методом. In: *Биоорганическая Химия* **16**(4), 1990, 524-530
- [67] Ludwig, J.; Eckstein, F.: Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one. In: *Journal of Organic Chemistry* **54**, 1989, 631-635
- [68] Schoetzau, T.; Hollet, T.; Cech, D.: A facile solid phase synthesis of 2'- and 3'-aminonucleoside triphosphates. In: *Journal of the Chemical Society (London), Chemical Communications* 1996, 387-388
- [69] persönliches Gespräch mit T. Schoetzau, Humboldt-Universität zu Berlin
- [70] Tarusova, N. B.; Dyatkina, N. B.; Langen, P.; von Janta-Lipinski, M.: The Phosphorylation of 9-(2-Deoxy-β-D-Ribofuranosyl)-2,6-Diaminopurine In: *Zeitschrift für Chemie* **27**(10), 1987, 366-367
- [71] Efimov, V. A.; Dubay, I. Y.; Chakhmakhcheva, O. G.: NMR study and improvement of H-phosphonate oligonucleotide synthesis. In: *Nucleosides & Nucleotides* **9**(3), 1990, 473-477
- [72] Kluger, R.; Pike, D. C.; Chin, J.: Kinetics and mechanism of the reaction of dimethyl acetylphosphonate with water. Expulsion of a phosphonate ester from a carbonyl hydrate. In: *Canadian Journal of Chemistry* **56**(13), 1978, 1792-1795
- [73] persönliches Gespräch mit Dr. F. Schubert, Humboldt-Universität zu Berlin
- [74] Hall, H. K.: Potentiometric Determination of the Base Strength of Amins in non-protolytic Solvents. In: *Journal of the Physical Chemistry* **60**, 1956, 63-70

- [75] Tabellenbuch Chemie. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1963, S. 173
- [76] persönliches Gespräch mit Dr. S. Müller, Humboldt-Universität zu Berlin
- [77] S. Schürer, J. Schliepe, D. Cech, unveröffentlichte Ergebnisse
- [78] Comess, K. M.; Costello, C. E.; Lippard, S. J.: Identification and Characterisation of a Novel Linkage Isomerization in the Reaction of trans-Diamminedichloroplatinum(II) with 5'-d(TCTACGCGTTCT). In: *Biochemistry* **29**(8), 1990, 2102-2110
- [79] Lippert, B.: Tris (nucleobase) Complexes Derived from cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. In: *Inorganica Chimica Acta* **56**, 1981, L23-L24
- [80] Beyerle, R.; Lippert, B.: Mixed Nucleobase Complexes cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>TX with T = 1-Methylthymine Anion and X = 1-Methylcytosine, 9-Ethylguanine, 9-Methyladenine and 9-Methyladeninium Cation. In: *Inorganica Chimica Acta* **66**, 1982, 141-146
- [81] Young, R. W.: A Re-examination of the Reaction Between Phosphorous Trichloride and Salicylic Acid. In: *Journal of the American Chemical Society* **74**, 1952, 1672-1673
- [82] Merck, E.: Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Darmstadt 1980, S. 109
- [83] Schmidt, S.; Pein, C.-D.; Fritz, H.-J.; Cech, D.: Chemical synthesis of 2'-desoxyoligonucleotides containing 5-fluoro-2'-deoxycytidine. In: *Nucleic Acids Research* **20**(10), 1992, 2421-2426
- [84] Organikum. 17. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1988, S. 79
- [85] Dawson, R. M. C.; Elliott, D. C.; Elliott, W. H.; Jones, K. M.: Data for Biological Research, Third Edition. Clarendon Press Oxford 1989, S. 103ff